

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Señalización intracelular y perfil epigenético de linfocitos B en la
inmunodeficiencia común variable**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lucía del Pino Molina

Director

Eduardo López Granados

Madrid, 2018

© Lucía del Pino Molina, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA

MOLECULAR Y BIOMEDICINA



**“SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y
PERFIL EPIGENÉTICO DE LINFOCITOS B
EN LA INMUNODEFICIENCIA COMÚN
VARIABLE”**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Lucía del Pino Molina

Bajo la dirección del Doctor

Eduardo López Granados

Madrid, 2017

El Dr. Eduardo López Granados, Doctor en Medicina, facultativo de la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario La Paz de Madrid,

CERTIFICA:

Que Doña Lucía del Pino Molina ha realizado bajo su dirección el trabajo “Señalización intracelular y perfil epigenético de linfocitos B en la Inmunodeficiencia Común Variable” para optar al grado de Doctor el cual, ha terminado con el mayor aprovechamiento, y que una vez revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado

En Madrid, a 20 de febrero de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eduardo Lopez', with a stylized flourish underneath.

Fdo: Eduardo López Granados

“Para mí, no hay emoción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en la ciencia como en el arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano. Mi mensaje dirigido sobre todo a la juventud, es que si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejaré de proporcionarles satisfacciones inigualables. Ciertamente es que abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que las satisfacciones no se olvidan jamás”

Severo Ochoa

Agradecimientos

Después de muchos años de esfuerzo, trabajo, sacrificio y dedicación aquí está mi esperada tesis. Para llegar hasta aquí tengo y quiero agradecer en primer lugar a mi director Eduardo. Gracias por darme la oportunidad hace ya 5 años de realizar el trabajo fin de máster y entrar a formar parte de Inmunología de La Paz. Si en aquél momento no hubieras confiado en mí nada de esto hubiera sido posible. Desde pequeña siempre quise ser bióloga y trabajar en un hospital, una parte del sueño cumplido. Gracias por tu apoyo y confianza durante todos estos años. Me siento muy orgullosa de haber sido la primera doctoranda de tu grupo y ver cómo en estos años hemos ido creciendo y hemos obtenido los primeros resultados, de muchos más que estoy segura llegarán.

Quiero dedicar esta tesis y agradecer a mis padres su apoyo, su dedicación y el ejemplo de perseverancia, constancia y actitud positiva que hemos recibido mi hermano y yo, somos lo que somos gracias a vosotros. Resulta difícil explicar con palabras todo lo que me gustaría deciros...

A mi hermano Pablo, el mejor hermano que puedo imaginar, gracias por tu genialidad, por tu apoyo, por conocerme como nadie. Y a Cris una más para nosotros.

Quiero dedicar esta tesis a mi familia, a mis abuelos, que por las circunstancias de la época no pudieron ir a la universidad, me hace feliz que mis abuelas pueden compartir conmigo esta ilusión. Esta tesis también es un poquito suya por el tiempo que no las he podido dedicar. Lo mismo quiero decir a mis primos Inés, Mario y Fabiola, que sepan que al final todo esfuerzo tiene recompensa. A mis tías y tíos por su apoyo y cariño.

A mis amigos, a Silvia casi no ha pasado tiempo desde que leíamos las revistas de Newton, aunque apenas las entendiéramos. A mis amigos de Cendejas de La Torre, no importa que no sepan exactamente en qué trabajo, “misiones de bióloga”, gracias por dedicarme una canción...

Al máster que me ha permitido conocer a algunas de mis mejores amigas, compañeras de fatigas, de trabajos del máster, de diversión, de viajes... Noelia, Ángela, Belén, Cris y Virginia.

A mis amigos biólogos, que esta bonita y dura profesión nos ha separado geográficamente, pero no importa, la amistad es para siempre y en el recuerdo quedan los años de facultad, la diversión de nuestros viajes, nuestros momentos semanales para contarnos penas y glorias!!! Noé el ejemplo a seguir, eres el número uno de buena persona, de mejor amigo y Estrella qué ejemplo de perseverancia todo llega y llegó, qué alegría!! Eugenia Berlín nos espera! Elena room mate! Gracias por abrirme las puertas de tu casa en Barcelona, por ser como eres. Giaco country mate! La casualidad nos coordinó para estar muy cerca en Holanda, qué bonitos recuerdos de nuestros fines por allí! Sandra que no te cabe el corazón en el pecho, por estar siempre pendiente de todos, por tener siempre palabras de aliento para todos.

A los responsables y compañeros de diferentes laboratorios en los que he estado trabajando colaborando y aprendiendo. Grupo de Cromatina y Enfermedad en Idibell Barcelona y el Grupo Biología del Linfocito B con la Dra. Almudena R. Ramiro en el CNIC; en especial a Javi en Barcelona y Virginia en el CNIC. A Esteban y mis compañeros de Barcelona por acogerme en el laboratorio como una más. A la Dra. Inmaculada Íbañez de Cáceres y a su grupo de Terapias experimentales y biomarcadores en cáncer, en especial a Olga.

A Mirjam y todo su grupo Primary Immunodeficiencies Research Group en Erasmus MC, por acogerme durante mi estancia en Rotterdam, allí viví durante tres meses una experiencia inolvidable. Ana y Rocío y los paseos por nuestro Rotterdam.

A todos mis compañeros de Inmuno, a todas las personas que allí trabajan gracias. Antonio, Miguel, Marga, Rita, Rebeca, a las secres, a la súper, a mis compañeras de Celular I, a Susana por su amabilidad, a Begoña, Josefina y Carmen por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por dejarme apoderarme del ordenador tantos años, mil gracias! Por los buenos momentos en las comidas, que tanto nos ha servido para desconectar por unos minutos del trabajo Alberto, Fernando, Pilar, Teresa, Ana, Beatriz, María, Yadira, Alejandro, Argentina y Borja. A María Coronel, porque este último año he tenido a una buena compañera y amiga, gracias por tu ayuda y comprensión. A Juan, el mejor compañero que podía imaginar, gracias por tu apoyo, por estar siempre dispuesto a ayudar, por ser tan brillante, llegarás tan lejos como te propongas con tu espíritu perseverante y trabajador. ¡Te mereces y te deseo lo mejor!

Índice

Índice	9
Índice de figuras	13
Índice de tablas	15
Resumen	17
Summary.....	23
Abreviaturas.....	28
Introducción.....	31
Introducción general	32
Inmunodeficiencia Común Variable	32
Definición Inmunodeficiencia Común Variable	32
Características y criterios diagnósticos IDCV	32
Causas monogénicas asociadas a IDCV.....	33
Linfocitos B	34
Diferenciación de los linfocitos B independiente de antígeno	34
Diferenciación de los linfocitos B dependiente de antígeno	35
Formación de células B de memoria	35
Formación de células plasmáticas	40
Otras subpoblaciones B	41
Activación y señalización intracelular del linfocito B	41
Supervivencia y apoptosis en los linfocitos B.....	43
Alteraciones inmunológicas descritas en la IDCV	45
Mecanismos epigenéticos	50
Definición Epigenética.....	50
microARNs: biogénesis y función	50

Relevancia de microARNs en la diferenciación del linfocito B	51
Metilación del ADN	53
Metilación del ADN e implicación en la diferenciación del linfocito B.....	54
Alteraciones en la metilación del ADN en linfocitos B IDCV	56
Hipótesis y objetivos	59
Hipótesis	60
Objetivos.....	61
Materiales y métodos.....	63
Base de datos clínicos y recogida de muestras de los pacientes	64
Bloque experimental I: Señalización intracelular linfocito B.....	66
Citometría de superficie para subpoblaciones B	66
Aislamiento de células mononucleares en gradiente de densidad por Ficoll	67
Citometría para proteína intracelular Bcl-2.....	67
Citometrías intracelulares para las proteínas Bcl-xl, Akt y S6	68
Citometría intracelular y activación con anti IgM para proteínas fosforiladas	70
Consideraciones generales para adquisición de muestras para citometría de flujo	73
Separación magnética de células <i>Naive</i> y activaciones con CD40L+IL-21	74
Extracción de ARN total y microARNs.....	77
Análisis de ARN mensajero por Q PCR de células <i>Naive</i> activadas	79
Bloque experimental II: Materiales y métodos microARNs	82
Separación magnética de células CD19 ⁺	82
Microarray de microARNs.....	83
Validación de microARNs por Q-PCR	84
Análisis de la expresión de los ARNm diana del microARN validado	85
Análisis de la expresión del microARN y de dianas en células <i>Naive</i> activadas....	85
Análisis estadístico y correlaciones diana microRNA (ARNm y proteína).....	86
Bloque experimental III: Materiales y métodos metilación ADN	87

Preparación de las muestras metilación	87
Extracción de ADN y ARN.....	88
Modificación con bisulfito	89
Selección de genes	90
Ensayo de activación y cambio de isotipo <i>in vitro</i> a partir de linfocitos B <i>Naive</i> ..	91
Pirosecuenciación con bisulfito.....	93
Ensayo para determinar el número de divisiones celulares que han sufrido las células (KREC)	96
Ensayo de las hipermutaciones somáticas (IgK REHMA)	97
Análisis estadístico.....	98
Resultados.....	99
Características clínicas de los pacientes	100
Bloque experimental I: Señalización intracelular linfocito B.....	103
Detección de la proteína intracelular Bcl-2.....	103
Detección de la proteína intracelular Bcl-xl.....	104
Expresión de ARNm en células <i>Naive</i> activadas <i>in vitro</i> con CD40L e IL-2.....	106
Señalización intracelular proteínas Akt y S6	111
Señalización de proteínas fosforiladas Akt y S6.....	112
Bloque experimental II: Análisis de la expresión de microARNs en linfocitos B ...	119
Microrray de expresión de microARNs	119
Validación de microARN seleccionados por Q-PCR	120
Análisis de la expresión de las dianas de miR-34a	123
Expresión del miR-34a y dianas en células <i>Naive</i> activadas con CD40L e IL-21	124
Bloque experimental III: Análisis perfil de metilación del ADN en linfocitos B	128
Selección de genes candidatos	129
Análisis del estado de metilación en las subpoblaciones B	132
Perfil de metilación en los pacientes IDCV relacionado con el fenotipo B	135

Historia replicativa de las células B y metilación del ADN.....	138
Frecuencia de las hipermutaciones somáticas en subpoblaciones B.....	142
Modelo de activación y cambio de isotipo <i>in vitro</i>	143
Discusión	145
Discusión de complicaciones y características de la cohorte estudiada	146
Discusión general de los resultados	151
Señalización intracelular	153
Expresión microARNs	162
Análisis metilación ADN	169
Conclusiones.....	177
Conclusions	180
Bibliografía.....	182
Anexo	192
Difusión de los resultados de la Tesis.....	192
Comunicaciones a congresos	192
Difusión resultados estrechamente relacionados con el tema de la tesis doctoral...	193
Publicaciones.....	193
Comunicaciones a Congresos.....	193

Índice de figuras

Figura 1: Criterios clínicos para establecer el diagnóstico de IDCV	33
Figura 2 Resumen del proceso de diferenciación B.	38
Figura 3: Principales vías de señalización intracelular del linfocito B.....	44
Figura 4: Diferentes patrones de bloqueo madurativo de los linfocitos B en IDCV.....	46
Figura 5: Los microARNs unión a ARNm.....	51
Figura 6: Efecto de la metilación del ADN en zonas promotoras.	54
Figura 7: Estrategia de análisis de las subpoblaciones B de sangre periférica.....	66
Figura 8: Estrategia de análisis de las IMF de Bcl-2 en las subpoblaciones B.	68
Figura 9: Estrategia de análisis de las proteínas intracelulares Bcl-xl, Akt y S6	70
Figura 10: Estrategia de análisis para detectar la fosforilación Akt y S6	73
Figura 11: Esquema activación de células <i>Naive</i>	74
Figura 12: Análisis de la pureza de las células <i>Naive</i>	75
Figura 13: Análisis de los marcadores de activación CD69 y CD86.	77
Figura 14: Análisis de la pureza de los linfocitos B	83
Figura 15: Estrategia de separación de las subpoblaciones B.	88
Figura 16: Aislamiento de células <i>Naive</i> con cambio de isotipo <i>in vitro</i>	93
Figura 17: Frecuencia de las complicaciones observadas en los pacientes IDCV.....	100
Figura 18: Descripción del número de pacientes con complicaciones clínicas.....	101
Figura 19: Frecuencia de pacientes IDCV según distribución de subpoblaciones B ...	102
Figura 20: Niveles de expresión de la proteína intracelular Bcl-2	103
Figura 21: Incremento de la expresión de Bcl-2	103
Figura 22: Niveles de expresión de Bcl-2 según fenotipo B	104
Figura 23: Niveles de expresión de la proteína intracelular Bcl-xl.	105
Figura 24: Niveles de expresión Bcl-xl según fenotipo B.....	106
Figura 25: Pureza de las células <i>Naive</i> activadas <i>in vitro</i>	106
Figura 26: Incremento de la IMF de CD69 y CD86.....	107
Figura 27: Expresión relativa del ARNm de la proteína Bcl-2 tras activación.	108
Figura 28: Expresión relativa del ARNm de la proteína Bcl-xl tras activación	108
Figura 29: Expresión relativa del ARNm de la proteína Bcl-xl tras activación pacientes IDCV con reducción de las subpoblaciones de memoria	109
Figura 30: Expresión relativa del ARNm de AID tras activación	110
Figura 31: Expresión relativa del ARNm de AID tras activación según el fenotipo B.	110

Figura 32: Inducción de la expresión de los ARNm de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl en células <i>Naive</i> activadas.	111
Figura 33: Niveles totales de la proteína Akt y de la proteína S6.	111
Figura 34: Incremento de los niveles de fosforilacion de Akt.....	112
Figura 35: Niveles de fosforilación de Akt en pacientes con autoinmunidad	114
Figura 36: Niveles de fosforilación de Akt en pacientes con linfoproliferación.....	115
Figura 37: Fosforilación basal Akt incrementada.....	115
Figura 38: Comparación fosforilación basal de Akt.....	116
Figura 39: Incremento de los niveles de fosforilacion de S6	116
Figura 40: Niveles de fosforilación de S6 en pacientes con autoinmunidad.....	117
Figura 41: Niveles de fosforilación de S6 en pacientes con linfoproliferación.....	118
Figura 42: Representación de la expresión de los miRNAs preseleccionados.....	119
Figura 43: Expresión de los microARNs en el microarray.	120
Figura 44: Expresión relativa microARNs seleccionados para validar por Q-PCR.....	122
Figura 45: Expresión relativa de los ARNm Bcl-2 y Foxp1	123
Figura 46: Relación entre la expresión relativa del miR-34a y la proteína Bcl-2	124
Figura 47: Expresión relativa del miR-34a en células <i>Naive</i> tras activación.	125
Figura 48: Incremento de la expresión relativa de miR-34 tras activación	125
Figura 49: Expresión relativa dianas de miR-34a, Bcl-2 y Foxp1 tras activación	126
Figura 50: Correlación expresión relativa miR-34a y Bcl-2 tras activación	126
Figura 51: Correlación expresión relativa de miR-34a y Foxp1 tras activación.	127
Figura 52: Representación de los datos de CpGs	129
Figura 53: Genes en los que se encuentran las CpGs seleccionadas	131
Figura 54: Metilación del ADN en las CpGs seleccionadas en diferentes genes.....	133
Figura 55: Metilación del ADN en las CpGs seleccionadas según fenotipo	136
Figura 56: Metilación del ADN en la CpG de <i>FOXO</i> en células <i>Naive</i>	138
Figura 57: Número total de divisiones celulares subpoblaciones B	139
Figura 58: Número de divisiones celulares transición <i>Naive</i> a linfocitos Sm.	139
Figura 59: Correlación divisiones celulares y metilación del ADN CpGs en <i>AID</i> y <i>FOXO</i>	141
Figura 60: Frecuencia de las SHM subpoblaciones B	142
Figura 61: Desmetilación del ADN <i>in vitro</i> CpGs en <i>AID</i> y <i>AKT1</i>	143
Figura 62: Resumen de resultados en los Linfocitos B de pacientes IDCv.....	152

Índice de tablas

Tabla 1: Número de pacientes incluidos en los diferentes estudios realizados	64
Tabla 2: Sexo y edad de los pacientes y controles analizados.....	65
Tabla 3: Cebadores de las CpG utilizados para la pirosecuenciación con bisulfito.	96
Tabla 4: Rangos de normalidad establecidos en el <i>Euroclass Trial</i>	101
Tabla 5: Frecuencias de las complicaciones clínicas y de subpoblaciones B en los diferentes grupos de pacientes analizados en distintos experimentos.	102
Tabla 6: Coeficientes de correlación de Spearman y P-valor miR34a y Bcl-2.	127
Tabla 7: Coeficientes de correlación de Spearman y P-valor miR34a y Foxp1.....	127
Tabla 8: CpGs seleccionadas para el análisis de la metilación del ADN	130
Tabla 9: Número divisiones celulares de cada subpoblacion B.	139
Tabla 10: Coeficientes de correlacion r de Spearman y P-valor número de divisiones celulares y el porcentaje de metilación del ADN	140
Tabla 11: Comparación de nuestra cohorte con otras series publicadas.	149

Resumen

“Señalización intracelular y perfil epigenético de linfocitos B en la Inmunodeficiencia Común Variable”.

Introducción

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es la inmunodeficiencia primaria sintomática más frecuente y cursa con hipogammaglobulinemia. Los pacientes diagnosticados de IDCV presentan infecciones de repetición y algunos además diversas complicaciones, como manifestaciones autoinmunes y linfoproliferativas, esplenomegalia, enfermedad pulmonar, presencia de bronquiectasias, enteropatía y a veces malignización. Todos los pacientes con IDCV presentan cierto grado de alteración del compartimento B, en la mayoría de los casos con una reducción severa de los linfocitos B de memoria e incapacidad de formación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. La IDCV es por tanto una deficiencia de anticuerpos que cursa con una severa desregulación de la respuesta inmune. Se trata de una enfermedad heterógena, en la que tan solo entre 2-10% de los pacientes diagnosticados parecen presentar causas monogénicas asociadas a la IDCV.

Hipótesis y objetivos

Como hipótesis de este trabajo se planteó si la alteración de la diferenciación, supervivencia y activación del linfocito B en la IDCV podría deberse a defectos en vías de señalización que conllevan a la activación de NF κ B y si mecanismos epigenéticos de control de la transcripción génica hasta ahora no explorados que pudieran estar implicados en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad. Debido a ello, se decidió estudiar vías de señalización dependientes de NF κ B, con funciones en la supervivencia y transmisión de señales intracelulares, así como explorar nuevas aproximaciones epigenéticas de análisis de los microARNs y la metilación del ADN en los linfocitos B de los pacientes con IDCV.

Resultados y discusión

La maduración del linfocito B requiere de la integración de diferentes señales de supervivencia y activación. El mantenimiento de células B maduras y de memoria en circulación requiere de señalización a través del BCR, de la familia de receptores del

TNF y de receptores de citoquinas que dan lugar a la activación de factores de transcripción clave, entre ellos NFκB. Esta señalización acaba induciendo la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2. Conocida la relevancia de la expresión de las proteínas antiapoptóticas en la supervivencia de los linfocitos B, se estudian los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-xl en linfocitos B *Naive*, B de memoria sin cambio de isotipo (USm) y las B de memoria con cambio de isotipo (Sm). El análisis pone de manifiesto la reducción de Bcl-2 en los estadios de linfocitos B de memoria, de forma más acusada en los linfocitos B Sm. En los controles se observa una tendencia de incremento de Bcl-2 desde los linfocitos B *Naive* hacia los estadios más diferenciados de linfocitos B de memoria, dicho incremento está reducido en los linfocitos B de los pacientes IDCV. Sin embargo para Bcl-xl no se observan diferencias en la expresión de la proteína entre pacientes y controles.

Ambas proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2: Bcl-2 y Bcl-xl tienen homología funcional pero diferente regulación que hace que participen en distintos programas de supervivencia y en distintos estadios de diferenciación. Bcl-2 tiene un papel más relevante en la supervivencia de linfocitos B *Naive* y de memoria, mientras que Bcl-xl se expresa de forma débil en los estadios *Naive* y de memoria, pero es muy abundante en las células del centro germinal (CG).

Para tratar de determinar si la señalización de la vía de NFκB está alterada en las células B de los pacientes IDCV, estudiamos la inducción de dos de las dianas de NFκB: *BCL-2* y *BCL-XL*, tras la activación de linfocitos B *Naive in vitro* con CD40L e IL-21. Los linfocitos B *Naive in vitro* al cabo de 4 días de estimulación son capaces de expresar los marcadores de activación CD69 y CD86, tanto en pacientes como en controles. Sin embargo, los pacientes con IDCV muestran una reducción en los niveles de ARNm de *BCL-2* y *BCL-XL* tras activación. Quedando de manifiesto el defecto en la señalización de NFκB, que impide el aumento de expresión de sus dianas antiapoptóticas. Además *BCL-XL* presenta *in vivo* mayor expresión en las células del CG, que es el estadio que se intenta reproducir con la activación *in vitro*, los pacientes con IDCV presentan una severa reducción de *BCL-XL* tras activación. Como control positivo de la activación también se analizan los niveles del ARNm de *AID*, cuya expresión solo se induce tras activación. Todos los controles y pacientes con IDCV son capaces de inducir la expresión de *AID*, sin embargo los pacientes muestran una

reducción significativa en los niveles de ARNm de *AID*, siendo esta más acusada en los pacientes que no tienen linfocitos B de memoria. Recientemente, otros estudios han descrito en los linfocitos B de pacientes con IDCV otras alteraciones en la vía de activación de NFκB.

La señalización intracelular del linfocito B, comprende numerosas y complejas vías de activación que a partir de la señalización recibida por el receptor BCR culminan en la activación de factores de transcripción clave como NFκB, para la diferenciación y activación del linfocito B. La activación del BCR también conlleva a la activación de PI3K, que es fundamental para la proliferación y supervivencia de las células B, activa a Akt que a su vez tiene múltiples dianas como la proteína ribosomal S6. Tanto Akt como S6 son dos de los intermediarios de la compleja cascada de señalización del linfocito B. En concreto, la activación de estas dos proteínas está mediada por fosforilación. Analizamos la fosforilación de estas dos proteínas en linfocitos B activados con anti IgM.

Se constatan defectos en la fosforilación de los linfocitos B de los pacientes con IDCV para Akt tanto en linfocitos B totales, como en linfocitos B *Naïve* la población mayoritaria de los pacientes, así como en los linfocitos USm que son los que más receptores de anti IgM presentan y los que tienen un umbral de activación menor para responder al estímulo. Esta subpoblación experimenta una menor fosforilación en Akt en los pacientes con IDCV para todos los tiempos de estímulos analizados. Para la proteína S6 también se observa reducción generalizada de la fosforilación en las células B de los pacientes a los tiempos más largos de activación con anti IgM estudiados (15 min).

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables que afectan a la función de los genes sin que haya cambios en la secuencia del ADN. Las principales marcas epigenéticas son la metilación del ADN, las modificaciones post-transcripcionales de histonas y los microARNs. El epigenoma de la célula es variable y va cambiando según el estado de diferenciación de las células. La accesibilidad de los factores de transcripción a las zonas regulatorias de los genes es necesaria para promover o impedir su transcripción, que a su vez está regulado de manera local por el estado de la cromatina que facilite o no la unión de dichos factores de transcripción.

Los microARNs son ARN no codificantes de pequeño tamaño, que pueden unirse a ARNm diana por complementariedad parcial de unos 6 nucleótidos, provocando su desestabilización y/o degradación, que tiene como resultado la reducción de los niveles de proteína. Como análisis exploratorio del estudio de microARNs, se realizó un microarray. Se seleccionaron para validar por Q-PCR los microARNs que mostraban una mayor expresión diferencial entre pacientes con IDCV y controles. Se comprobó por Q-PCR que el miR-34a presenta una mayor expresión en los linfocitos B de pacientes IDCV que los controles. MiR-34a regula múltiples dianas entre las que se encuentran dos de relevancia para la biología del linfocito B como Bcl-2 y Foxp1. Observamos que existe correlación negativa significativa entre miR-34a y la proteína Bcl-2, la mayor expresión del miR-34a va acompañado de la menor expresión de la proteína Bcl-2 en linfocitos B totales de pacientes. El aumento de la expresión de miR-34a puede estar implicado en la menor supervivencia y diferenciación B en periferia a través de la desestabilización de sus dianas, como es Bcl-2. El aumento del miR-34a y sus consecuencias se han estudiado provocando dicho aumento de forma extrínseca, así se ha descrito su implicación en apoptosis y arresto del ciclo celular. Por otro lado se sabe que la sobreexpresión de miR-34a en médula ósea va acompañada de la reducción de otras de sus dianas Foxp1 y provoca un bloqueo en la diferenciación B, falta por confirmar si aquellos pacientes IDCV con números reducidos de linfocitos B en periferia pudieran deberse a niveles elevados de miR-34a ya en los estadios iniciales de médula ósea. Este es el primer estudio de microARNs, que tengamos constancia hasta el momento, de desregulación en la expresión de microARNs en la patogenia de la IDCV.

La metilación del ADN está mediada por la familia de enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) que transfieren un grupo metilo en la posición 5' de las citosinas, localizadas en dinucleótidos CpG. La presencia de islas CpG en la región promotora de los genes o en zonas adyacentes está asociada con represión génica, debido a que la metilación interfiere con la accesibilidad y el reclutamiento de factores de transcripción a la secuencia del ADN.

En un estudio previo en el que colaboramos e identificamos CpGs con diferente metilación en linfocitos B de una pareja de gemelos monoigóticos discordantes para IDCV. En concreto la hipermetilación que experimentaban los linfocitos B de memoria del gemelo afecto. Estos resultados se confirmaron en una cohorte de pacientes de nuestra consulta de pacientes con IDCV, que mostraron la menor desmetilación que

sufren CpG concretas en la transición desde linfocitos B *Naive* a linfocitos B de memoria en ciertos genes relevantes para la biología del linfocito B. En este trabajo, hemos querido profundizar en estos hallazgos tomando un abordaje experimental complementario, a partir de los datos disponibles de Kulis et al, seleccionando CpGs en genes implicados en la supervivencia del linfocito B (*BAFFR*), la vía de activación de PI3K (*AKT* y *FOXO*), la vía canónica y alternativa de NFκB (*BCL-10*, *MALT1* y *NFκB2*), la señalización mediada por JAK/ STAT (*STAT3*), el regulador de la reacción del CG (*BCL-6*) y *AID* fundamental para CSR y SHM en el CG. Todas las CpG seleccionadas sufren desmetilación en población sana entre los estadios de linfocitos B *Naive* y linfocitos B de memoria. La alteración en la desmetilación no es un fenómeno general ni inespecífico, puesto que para 3 de las 9 CpGs estudiadas no hemos observado diferencias en la desmetilación entre pacientes y controles. Sin embargo, para otros genes relevantes como son *AID*, *BCL-6*, *FOXO*, *NFKB2*, *AKT1* y *STAT3* se constatan diferencias en los niveles de metilación de los linfocitos Sm, presentando los pacientes con IDCV niveles más altos y quedando de manifiesto la incapacidad de desmetilar en la transición desde células *Naive* hacia células B de memoria en ciertas CpG en comparación con los controles. La hipermetilación de las células Sm y algunas USm de estos genes es más acusada en pacientes con reducción de subpoblación de memoria. Estos resultados sugieren que la hipermetilación puede estar contribuyendo a los números reducidos de células de memoria en los pacientes con IDCV. Además las células Sm de los pacientes con IDCV acumulan menos divisiones celulares desde el estadio *Naive* comparado con los controles. Para las CpG analizadas en *AID* y *FOXO* se observa una correlación negativa entre el número de divisiones y la hipermetilación de las células Sm de los pacientes con IDCV, no siendo así para el resto de CpG ni para ningún caso en los controles.

Conclusiones

Las alteraciones en la inducción de proteínas antiapoptóticas, así como los defectos en la vía de señalización mediada por fosforilación tras activación del BCR, sugieren defectos en la señalización intracelular del linfocito B en la IDCV. El enfoque epigenético de la enfermedad pone de manifiesto la implicación de nuevos factores de control transcripcional y abre la vía de futuros estudios en esta línea. El aumento de expresión del miR-34a que podría estar favoreciendo la apoptosis de las células B en la IDCV, junto la alteración en la desmetilación, de genes clave para la biología del

linfocito B, en la transición de células *Naive* a células Sm podrían estar contribuyendo como factores patogénicos en la desregulación del linfocito B en la IDCV.

Summary

“Intracellular signaling and epigenetic profile of B lymphocytes in Common Variable Immunodeficiency”

Introduction

Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the most prevalent symptomatic primary immunodeficiency. Antibody deficiency, hypogammaglobulinemia, increased infection susceptibility are common to all CVID patients, but autoimmunity, lymphoproliferation, splenomegaly, lung disease, bronchiectasis, enteropathy and malignancy are present in some patients. A defining feature in all CVID patients is some degree of B cell abnormality, mostly severe reduction in circulating class-switched memory B cells and the inability of immunoglobulin-secreting plasma cells production. CVID is a highly variable antibody deficiency with a severe impairment in the immune response. CVID is a heterogeneous and often undefined genetic background disease, where only 2-10% of patients present a monogenic defect.

Hypothesis and objectives

The hypothesis of this work was that impaired differentiation, survival and activation of B cells in CVID patients could be due to underlying molecular mechanism in the NFκB signaling pathway and other possible epigenetic mechanisms related to control of gene transcription. The aim of this work is the study of NFκB dependent signaling pathway related to B cell survival and intracellular signal transmission. We intend to explore new epigenetic approaches, microRNAs and DNA methylation, in B cells from CVID patients.

Results and discussion

B cell maturation requires the sequential integration of different survival and activation signals. The maintenance of circulating resting mature and memory B cells requires signaling via BCR, TNFR family and cytokines receptors leading to the activation of clue transcription factors, as NFκB. Ultimately this signaling also up-regulates the expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. B cell survival in periphery requires from prosurvival factors such as the Bcl-2 antiapoptotic family.

We analyzed protein expression levels of Bcl-2 and Bcl-xl proteins in Naïve, Unswitched memory B cells (USm) and Switched memory B cells (Sm) from CVID patients and healthy donors. Bcl-2 protein is severely reduced in the memory B cell compartment from CVID patients, in particular in Sm B cells. In healthy donors we detected an increment of Bcl-2 expression in the transition from Naïve to Sm B cells, less evident in B cells from CVID patients. However expression levels of Bcl-xl protein are similar in B cells subpopulations from CVID patients and controls.

Both antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xl share functional homology but differ in regulation of B cell survival in different subpopulations. Bcl-2 has a relevant role for Naïve and memory B cell survival, while Bcl-xl is weakly expressed in Naïve and memory B cells, but Bcl-xl is highly expressed in germinal center B cells (GC).

We sought to determine if NFκB signaling was impaired in B cells from CVID patients, for this purpose we studied the induction of *BCL-2* and *BCL-XL*, target genes of the NFκB pathway, after Naïve B cell activation with CD40L and IL-21. Naïve B cell activated *in vitro* for 4 days, can upregulate the expression of activation markers CD69 and CD86 in both CVID patients and controls. However, Naïve B cells from CVID patients present a reduced induction of *BCL-2* and *BCL-XL* mRNAs after Naïve B cell activation. The discovery of NFκB signaling defects suggests a possible role for increased apoptosis as a contributor to the B cell defect in CVID. *In vitro*, Naïve B cell activation after 4 days try to reproduce a GC B cell-like, *BCL-XL* is highly expressed in GC B cells *in vivo*, CVID patients present a severe reduction in *BCL-XL* induction. *AID* was also included in the study as a positive control, since *AID* expression is only upregulated after Naïve B cell activation. Activated Naïve B cells from CVID patients and controls can upregulated *AID*, but it is severely reduced in CVID patients, in particular in CVID patients with reduced numbers of Sm B cells. Recently other studies have described more related alterations in NFκB signaling in B cells from CVID patients.

B cell intracellular signaling comprise a multitude of complex signaling pathways BCR mediated, that lead to the activation of several transcription factors, such as NFκB and others related with B cell survival and differentiation. BCR activation entails PI3K signaling, essential for B cell proliferation and survival. PI3K activates Akt, which in turn has several key targets such as the ribosomal protein S6. Akt and S6

are both intermediates in the complex B cell signaling pathway, their activation is mediated by phosphorylation. We analyzed Akt and S6 phosphorylation induced by anti IgM activation in B cells.

We observed reduced Akt phosphorylation in total B cells, Naïve and is particularly reduced the phosphorylation in USm B cells from CVID patients after 5, 10 and 15 minutes of BCR activation. This is noteworthy because USm B cells have a lower activation threshold due to the high amount of IgM receptors in the surface. S6 phosphorylation is also impaired in B cells from CVID patients for the longest stimulation time point after 15 minutes with anti IgM.

Epigenetic refers to those heritable alterations in the genome that do not change the DNA sequence. The main epigenetic marks are: DNA methylation, post translational histone modifications and microRNAs. The epigenome of a cell is variable and changes depending on the differentiation stage of the cells. Gene transcription is also depending on the accessibility of transcription factors to the DNA sequence.

MicroRNAs are short non coding RNAs, can target for 6 nucleotide region complementarity mRNAs, leading to mRNA degradation or destabilization and reduction of protein expression. For the first exploratory analysis of microRNA expression a microarray was performed. Several microRNAs showed different expression between CVID patients and controls, and we selected some of them for further validation by Q-PCR. We confirmed higher expression levels of miR-34a in B cells from CVID patients. This microRNA is relevant for B cell biology, miR-34a can target Bcl-2 and Foxp1 proteins. We observed a negative correlation between miR-34a expression and Bcl-2 protein expression, we detected a reduction of Bcl-2 in total B cells from CVID patients due to higher miR-34a levels, which could impact in B cell survival. Mir-34a overexpression is described to promote apoptosis and cell cycle arrest mainly due to the p53-miR-34a-SIRT1 axis. Also miR-34a overexpression in bone marrow reduces Foxp1 expression and block B cell differentiation. It would be interesting to confirm if the reduction of B cells in periphery in some CVID patients can be related to miR-34a expression in bone marrow. This is to our knowledge, the first study of microRNAs in B cells from CVID patients.

Finally DNA methylation is mediated by the DNA methyltransferases (DNMT) family of enzymes, which transfer a methyl group at C-5 cytosine preferentially at CpG

dinucleotides. The presence of CpG islands in the promoter region of genes is associated with gene repression, methylation interferes with the accessibility and recruitment of transcription factors to the DNA sequence.

In a previous paper, we identified for the first time a molecular mechanism that could be contributing to the impaired differentiation and activation of B cells in CVID. A high-throughput DNA methylation analysis in a pair of CVID-discordant monozygotic twins showed predominant gain of DNA methylation in CVID B cells in critical genes for B cell biology, later confirmed in a large cohort of CVID patients. In this work, we expanded our initial observation of impaired demethylation of memory B cells, by a novel approach based on new data available from Kulis et al comprehensive work. We selected relevant CpG in genes involved in B cell survival (*BAFFR*), signaling mediators PI3K pathway (*AKT* and *FOXO*), canonical and alternative NFκB pathway (*BCL-10*, *MALT1* and *NFκB2*), JAK/Stat activation (*STAT3*), regulation of GC reaction (*BCL-6*) and *AID* essential for CSR and SHM in the GC reaction. All selected CpGs presented higher levels of methylation in Naïve B cells, with significant demethylation in the transition to Sm B cells in normal controls. Mean methylation levels were similar in CVID USm in Sm B cells in CpGs nearby promoter regions of *MALT1*, *Bcl-10* and *BAFF-R* compared to healthy donors. For the selected CpGs in *AID*, *BCL-6*, *FOXO*, *AKT1* and *STAT3* CVID Sm B cells showed significant mean hypermethylation compared to the mean in healthy donors. Therefore, impaired demethylation in CVID Sm B cells is present in some interrogated CpGs in our study.

The hypermethylation present in Sm B cells and in some USm from CVID patients is more evident in those patients with severe reduction of memory B cells. This implies that hypermethylation could be contributing to decreased percentages of memory B cells in CVID. We also observed that CVID SmB cells accumulate globally significantly less cell divisions between the *Naïve* to Sm B cell transition. A significant negative correlation between higher methylation levels in Sm B cells and lower number of cell divisions from Naïve to SmB cells is observed in CVID patients for those CpGs in *AID* and *FOXO*. We did not observe clear correlations in for the rest of CpGs in CVID patients and neither in healthy donors.

Conclusions

Alterations in the induction of antiapoptotic proteins, as well as defects in the signaling pathway mediated by phosphorylation following BCR activation, suggest defects in B cell lymphocyte signaling in CVID. The epigenetic approach of the disease reveals the implication of new factors of transcriptional control and invites us for future studies in this line. The increased expression of miR-34a that could be favoring the apoptosis of the B cells in CVID. Together with the alteration in the demethylation of key genes for B lymphocyte biology, in the transition from *Naive* cells to Sm cells could be contributing as pathogenic factors in B lymphocyte dysregulation in CVID.

Abreviaturas

ADN: ácido dexosirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AF488: del inglés, alexa fluor 488

AID: desaminasa inducida por activación

AKT: alfa serín treonín kinasa

APC: del inglés, alofocianina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: mensajeros del ácido ribonucleico

BAFFR: receptor del factor activador de los linfocitos B

BCL-10: gen asociado a linfomas de células B número 10

BCL-2: gen asociado a linfomas de células B número 1

BCL6: gen asociado a linfomas de células B número 6

BCR: receptor de membrana del linfocito B

BSA: del inglés, albúmina de suero bovino

BV421: del inglés, brilliant violet 421

C: citosinas

Ca²⁺: calcio

CD40L: CD40 ligando

CG: Centro germinal

CLP: progenitor linfoide común

CMV: citomegalovirus

CpG: dinucleóticos de citosina y guanina

CSR: del inglés, cambio de clase de inmunoglobulina por recombinación

Ct: ciclo de amplificación

DAG: diacilglicerol

DNMTs: ADN metiltransferasas

dNTPs: deoxinucleótidos

EBV: virus Epstein Barr

EEM: error estándar de la media

ESID: Sociedad Europea de Inmunodeficiencias

FITC: isocianato de fluoresceína

FOXO: *forkhead box*

FOXPI: *forkhead box P1*

FSC: tamaño celular, del inglés *forward scatter*

GLILD: enfermedad pulmonar intersticial linfocítica granulomatosa

Hsa: *homo sapiens*

HSC: células madre hematopoyéticas

IDCV: Inmunodeficiencia Común Variable

IDP: Inmunodeficiencia Primaria

IFN γ : interferon gamma

Ig: Inmunoglobulina

IgK REHMA: del inglés, ensayo para determinar frecuencia de hipermutaciones somáticas

IgM, D, A, G: isotipos M, D, A, G.

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad media de fluorescencia

IP3: inositol trifosfato

K⁺: potasio

KREC: del inglés, ensayo para determinar número de divisiones celulares

LIP: neumonía intersticial linfoide

LNH: linfoma no Hodking

LOCID: inmunodeficiencia combinada de debut tardío

MALTI: gen tejido linfoide asociado a musosas
1

Mg⁺: magnesio

Min: minutos

MiR: microARN

NFKB2: factor nuclear kappa de células B subunidad 2

NFκB: factor nuclear estimulador de la cadena kappa de células B

P53: proteína supresora tumoral 53

Pb: pares de base

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica

PBS: del inglés, tampón fosfato salino

PCR: del inglés, reacción en cadena polimerasa

PE Cy7: ficoeritrina cianina 5

PE: ficoeritrina

PERCP: proteína clorofila peridina

Q-PCR: PCR cuantitativa

RB: *running buffer*, tampon

RE: retículo endoplasmático

RPM: revoluciones por minuto

RPMI: del inglés, medio *Roswell Park Memorial Institute*

SD: desviación estándar

Ser: serina

SHM: del inglés, hipermutación somática

Sm: células B de memoria sin cambio de isotipo de Inmunoglobulina

SSC: complejidad celular, del inglés *side scatter*

STAT3: transductor de la señal y activador de la transcripción 3

STF: suero de ternera fetal

TCR: receptor de membrana de linfocitos T

Thf: linfocitos T cooperadores foliculares

TLR: receptores de tipo Toll

Treg: células T reguladoras

U: Uracilos

USm: células B de memoria sin cambio de isotipo de Inmunoglobulina

V(D)J: recombinación de los segmentos V (variable), D (diversidad), J (del inglés, *joining*)

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Introducción

Introducción general

Inmunodeficiencia Común Variable

Definición Inmunodeficiencia Común Variable

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) se definió en principio como un conjunto de síndromes con hipogammaglobulinemia y su diagnóstico se realizaba por exclusión de otras deficiencias de anticuerpos. En el año 2009 un comité de expertos internacionales redefinió el término como conjunto de alteraciones de la Inmunodeficiencia Común Variable, para resaltar la naturaleza heterogénea y poligénica de esta inmunodeficiencia primaria que cursa con hipogammaglobulinemia.^{1 2}

La IDCV es la inmunodeficiencia primaria (IDP) sintomática más frecuente, según los últimos datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) con una prevalencia estimada de entre 1:10.000 y 1:100.000 de la población. La IDCV agrupa una serie de trastornos caracterizados por hipogammaglobulinemia, descenso de la inmunoglobulina G (IgG) al menos dos desviaciones estándar (SD) por debajo de la media para la edad, que suele ir acompañado del descenso de IgA y/o IgM. La IDCV tiene igual prevalencia en ambos sexos, con dos picos de debut uno en la infancia a partir de los 4 años y otro en la edad adulta entorno a los 30-40 años.

Características y criterios diagnósticos IDCV

Los criterios diagnósticos de la IDCV se detallan en la Figura 1.

Los pacientes suelen presentar una historia clínica de infecciones recurrentes en el momento del diagnóstico y suelen presentar una o varias de las siguientes complicaciones clínicas: autoinmunidad, linfoproliferación, enfermedad pulmonar, granulomas, enteropatía y malignización.^{3 4}

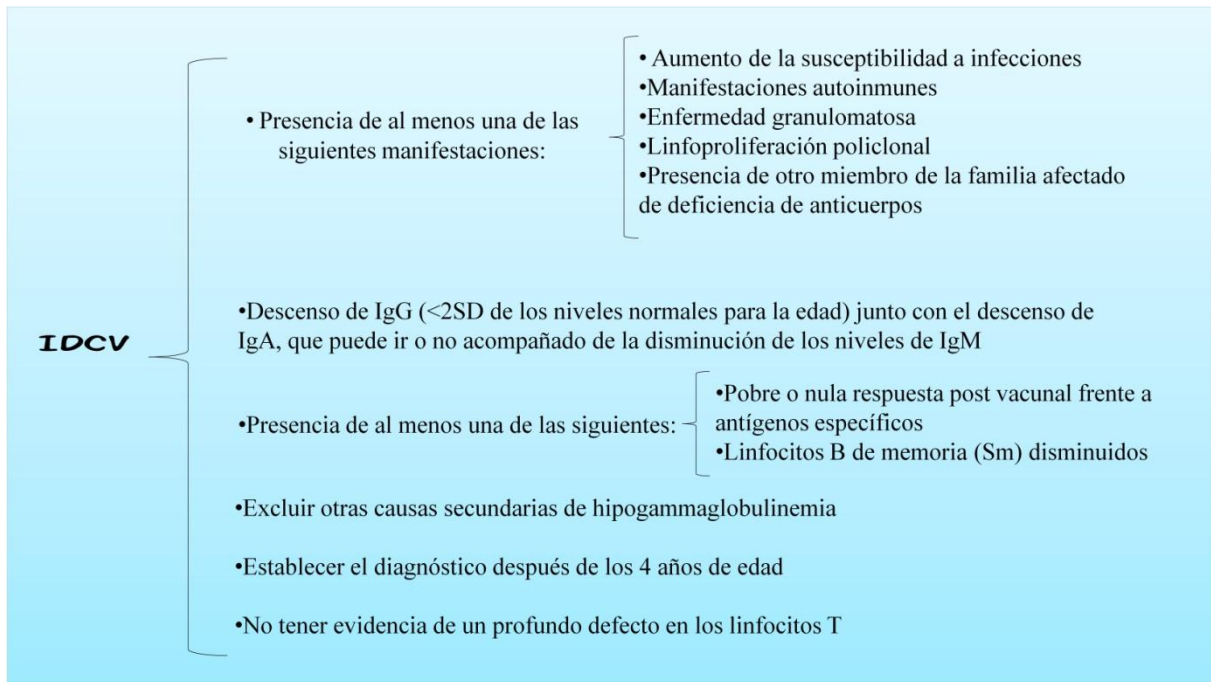


Figura 1: Criterios diagnósticos de la IDCV definidos por la ESID. (Figura adaptada del Registro de Criterios Clínicos definidos por la ESID).

Causas monogénicas asociadas a IDCV

A pesar de los grandes esfuerzos empleados en identificar las posibles causas monogénicas subyacentes a la enfermedad, tan solo entre un 2% y 10% de los pacientes se encuentran mutaciones o variantes predisponentes en algunos de los siguientes genes: *CD19*, *CD81*, *CD20*, *CD21*, *ICOS*, *TACI*, *BAFFR*, *TWEAK*, *CD27*, *IL-21*, *IL-21R*, *LRBA*, *CTLA4*, *PIK3CD*, *IKAROS*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PRKCD*, *PIK3R1*, *VAV1*, *RAC2*, *BLK* e *IRF2BP2*^{5 6 7 8 9 10 11 12 13 14}. Cabe destacar que algunas de las variantes asociadas con el curso clínico de la IDCV también han sido encontradas en la población sana, como puede ser el caso de *TACI* entre otras, quedando por tanto como genes de susceptibilidad más que causantes de la enfermedad^{2 15}. Conocer algunos de los genes causantes no ha modificado mucho el manejo clínico, a excepción de aquellos genes que parecen favorecer las complicaciones por desregulación inmunológica como *LRBA*, *CTLA4* y *PIK3CD*. Demostrar un cambio patogénico en estos genes puede sugerir una diana terapéutica para algunas de estas complicaciones. A pesar de la aplicación creciente de técnicas de secuenciación masiva, el porcentaje de pacientes cuyo fenotipo con IDCV puede explicarse por una causa monogénica sigue siendo bajo^{5 16 17}. Este hecho junto con la variabilidad en la presentación y desarrollo de la enfermedad, la edad

de debut variable, la progresión en ciertos casos desde deficiencia aislada de IgA a IDCV, hacen pensar que la IDCV se trata en gran medida de una enfermedad poligénica y multifactorial.

Linfocitos B

El rasgo común de la desregulación del sistema inmune en todos pacientes con IDCV es la alteración en alguna medida del compartimento de linfocitos B, con la consecuencia final común del fallo en la producción de anticuerpos y los bajos niveles de Igs.

Diferenciación de los linfocitos B independiente de antígeno

Los linfocitos B reconocen los patógenos a través de sus receptores de membrana (BCRs), se estima que hay entre 120.000 a 200.000 copias de BCRs por linfocito B ¹⁸. Los linfocitos B son capaces de reconocer una gran cantidad de antígenos diferentes, gracias a los procesos de recombinación V(D)J y el fenómeno de hipermutación somática (SHM), con la diversidad funcional de anticuerpos otorgada por el proceso de recombinación por cambio de clase (CSR).

Los linfocitos B se generan en la médula ósea (Figura 2) a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) que se diferencian a progenitores multipotentes, que a su vez gracias al microambiente de la médula ósea y a las células estromales, dan lugar al progenitor linfoide común (CLP). El compromiso con el linaje B viene determinado por factores de transcripción como E2A, EBF1 que coordinan la expresión de genes específicos del linaje: como *CD79a*, *CD79b*, *CD179a*, *CD179b*, *Pax5* y *FOXO 1* ¹⁹.

Durante el estadio pro-B se activa la recombinación mediada por las RAG (las enzimas de recombinación activa) de los segmentos V(D)J, si dichos reordenamientos son exitosos se produce la cadena pesada μ . La transición desde el estadio pro-B al siguiente estadio denominado pre-B, va acompañada de varias rondas de división celular y continua con el reordenamiento de las cadenas ligeras, primero κ y después la cadena ligera λ . Las cadenas pesadas y ligeras reordenadas se expresan en superficie

junto con Ig α /Ig β dando lugar a la expresión del BCR maduro, además se extiende la transcripción del locus de la cadena pesada para expresar de forma simultánea IgD e IgM en superficie, en este estadio los linfocitos B se denominan transicionales ²⁰.

Las células transicionales sufren primero una selección positiva, los receptores recién formados deben ser lo suficientemente competentes, seguido de la selección negativa donde se testa la tolerancia a antígenos propios. Las células que no reconozcan con gran reactividad los antígenos propios siguen su diferenciación en periferia, mientras que las células autorreactivas pueden sufrir un proceso llamado de edición del receptor, para producir un nuevo receptor, otras células potencialmente autorreactivas pueden ser inactivadas mediante los fenómenos de anergia o morirán por apoptosis por delección clonal.

Diferenciación de los linfocitos B dependiente de antígeno

Por tanto, el desarrollo inicial de las células B ocurre en medula ósea y es independiente del antígeno, se generan células B maduras competentes que migran a periferia donde prosiguen su desarrollo a células *Naive* (Figura 2).

Las células *Naive* recirculan entre la sangre periférica y los órganos linfoides secundarios, donde se encontrarán con los antígenos transportados por células dendríticas, macrófagos y otras células especializadas ²¹.

Las células *Naive* sufren, previo a la activación por el BCR, una proliferación homeostática que consta de 1 o 2 divisiones celulares. Esta proliferación, en ausencia de antígeno se debe a la estimulación por citoquinas y señalización esenciales para su supervivencia, fundamentalmente a través del receptor del factor activador de los linfocitos B (BAFFR) ^{22 23}. Las células *Naive* pueden mantenerse en circulación hasta que se encuentren con el antígeno, cuando se activará su BCR y serán rescatadas de morir por apoptosis.

Formación de células B de memoria

Los linfocitos B *Naive* tras el reconocimiento antigénico se diferencian a células de memoria. En humanos el marcador para diferenciar las células B de memoria es CD27 ^{24 25}. La generación de células de memoria asegura una respuesta robusta y

longeva, puesto que en una segunda exposición al antígeno, son capaces de diferenciarse rápidamente a células plasmáticas productoras de anticuerpos. La supervivencia o longevidad de las células B de memoria reside en la señalización tónica que reciben y que da lugar a la activación del BCR, que acaba favoreciendo la expresión de proteínas de la familia antiapoptótica de Bcl-2 ²⁶. Las células B de memoria pueden generarse con la ayuda proporcionada por los linfocitos T (respuesta T dependiente) o sin ella (respuesta T independiente).

Respuesta T dependiente

En el caso de la respuesta T dependiente, tanto el linfocito T como el B reconocen el mismo antígeno, se activan e inician la llamada cooperación B-T por el reconocimiento a través de CD40-CD40L. La ayuda de los linfocitos T, provee a los linfocitos B de señales que favorecen su proliferación y supervivencia, así como señales de adhesión y atracción. Gracias a dicha interacción se inician dos procesos fundamentales como son la hipermutación somática (SHM) y el cambio de clase de inmunoglobulinas (CSR) para la posterior diferenciación a células plasmáticas ²⁷.

Además de la interacción CD40-CD40L resulta fundamental la señalización prestada por diversas citoquinas como la interleuquina 4 (IL-4), IL-10, IL-13 e IL-21. Las citoquinas son proteínas solubles que pueden funcionar como factores de crecimiento y diferenciación de forma paracrina o autocrina. De todas las mencionadas, la IL-21 parece ser la que media respuestas más potentes en cuanto a efectos de proliferación y diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro* ²⁸. La IL-21 está producida por un subtipo de células T CD4+, las T cooperadoras foliculares (Thf) del centro germinal (CG). Las células B poseen el receptor de IL-21 en superficie que transmite la señalización mediada por la IL-21 a través de las vías de señalización JAK/STAT, en concreto se activa *STAT3*. Esta señalización se ha demostrado, esencial para la generación de células efectoras a partir de células *Naive* ²⁹. La IL-21 promueve el inicio de la reacción del CG y favorece la expresión de *BCL-6*. También induce la expresión de *Blimp1* y la diferenciación terminal de las células B del CG hacia células plasmáticas ^{28 30}.

Las células B del CG tienen naturaleza apoptótica y dependen de señales de supervivencia como CD40-CD40L y la unión de IL-21 que les proveen las células Thf del CG ³⁰.

Tras la cooperación T-B los linfocitos B pueden encaminarse por distintas rutas madurativas (Figura 2): diferenciarse a células plasmáticas de vida media corta, generar células B de memoria independiente de la reacción del CG o dependientes de la formación del CG. Las células B de memoria generadas sin reacción del CG son IgM+, ya que no han realizado el cambio de clase de Ig y las denominamos células B de memoria sin cambio de isotipo (USm). Las que acometen la reacción del CG son linfocitos B de memoria que podrán hacer el cambio de clase y denominamos linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (Sm). Los factores que determinan que se inicie o no la reacción del CG en respuestas T dependientes permanecen en parte desconocido. Algunos estudios recientes sugieren que dicha decisión puede estar influenciada por la cantidad de antígeno presentado por los linfocitos B a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) a las Thf y del tiempo que dure esta interacción en el borde de los nódulos linfáticos o el bazo. De manera, que si la interacción es lo suficientemente fuerte y larga es más probable que se acabe generando la reacción del CG ²⁶. Aunque la mayor parte del conocimiento de estas vías de diferenciación de los linfocitos B de memoria ha sido descrito en modelos murinos, en humanos hay evidencias de la formación de los linfocitos B de memoria tanto de forma dependiente como independiente del CG ²⁴.

Reacción del centro germinal y papel de AID

En las respuestas T dependientes, en los órganos linfoides secundarios se originan unas estructuras denominadas centros germinales (CG), en las que se distingue histológicamente entre la llamada zona clara donde la célula B o aquí denominada centrocito se encontrará con el antígeno presentado por las células dendríticas foliculares, y una zona llamada oscura en el que las células B en división, llamadas centroblastos, que proliferan por SHM. La movilidad de los linfocitos B entre ambas zonas es dinámica y está favorecida por la expresión de las quimioquinas CXCR4 y CCR5 ^{31 32}. Para que esta reacción del CG tenga lugar es esencial el inicio de programas transcripcionales específicos, iniciados por la expresión del gen *BCL-6* que es el regulador transcripcional que inicia y mantiene la reacción el CG ^{33 34}.

La cooperación B-T en las respuestas T dependientes conduce a dos de los procesos más importantes que ocurren en la reacción del CG y que están mediados por AID: la SHM y CSR. Primero los linfocitos B que se encuentran en la zona oscura del CG inician la proliferación mediada por SHM, aquellos linfocitos que consigan una

mayor afinidad por el antígeno serán seleccionados para que migren a la zona clara del CG e iniciar la reacción del CSR.

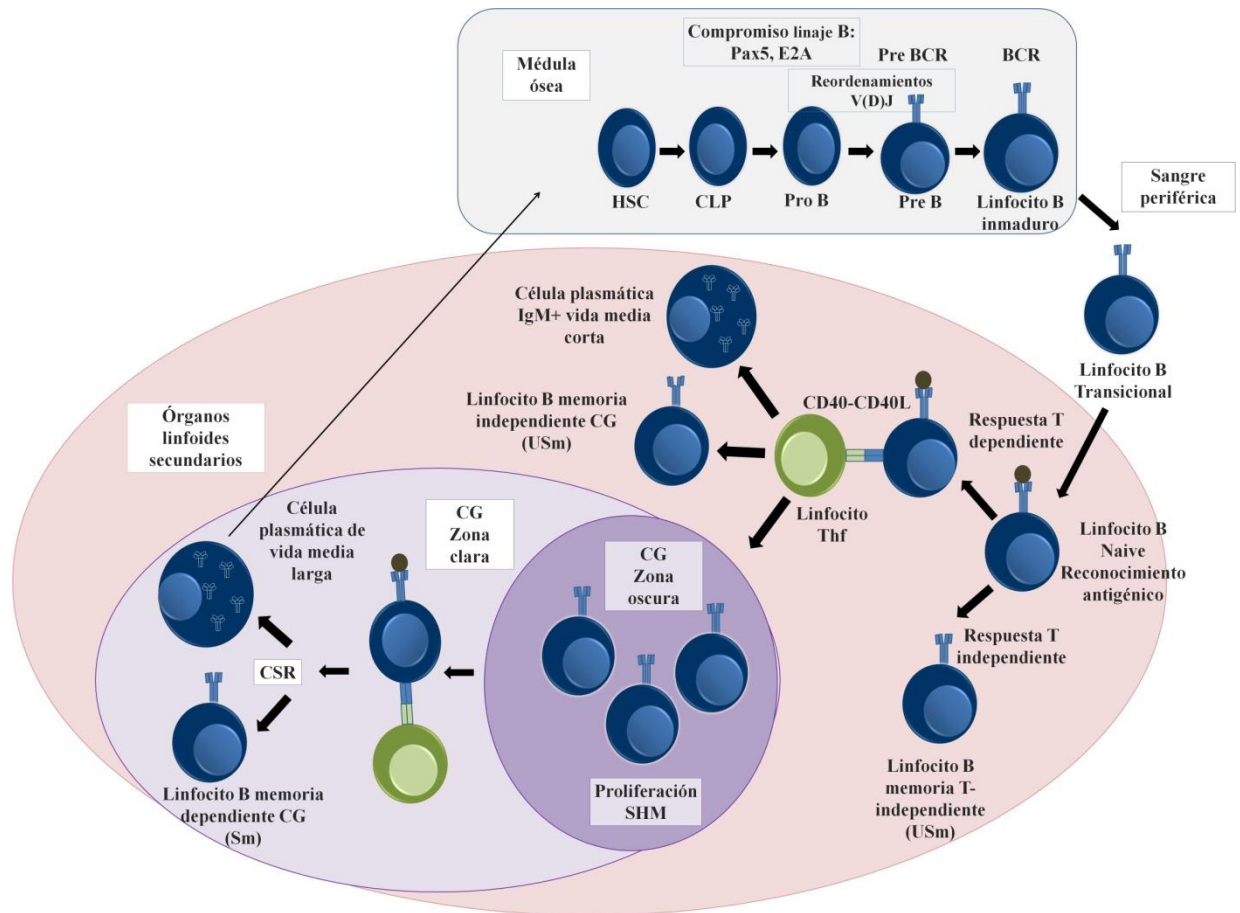


Figura 2 Resumen del proceso de diferenciación B: Los estadios iniciales de diferenciación B ocurren en ausencia de antígeno, en la médula ósea, donde se establece el compromiso con el linaje B, por factores de transcripción específicos. Durante los estadios pro B y pre B hay recombinación de los segmentos V(D)J que acaban generando un BCR expresado en la superficie de linfocitos B maduros que salen a periferia como linfocitos B transicionales. En la periferia recirculan por los órganos linfoides secundarios hasta su encuentro con el antígeno, en este momento los linfocitos B *Naive* se activan y puede llevar a cabo su diferenciación de forma T independiente, con la generación de linfocitos B de memoria USm. Si por el contrario los linfocitos Thf colaboran con los linfocitos B pueden dar lugar a linfocitos B de memoria pero independientes de la reacción del CG, diferenciarse rápidamente a células plasmáticas de vida media corta, o bien la colaboración con el linfocito Thf puede dar lugar a la formación de los CG. En la zona clara del CG se inicia el proceso de SHM y proliferación, los linfocitos B con mayor afinidad, vuelven a encontrarse con los T en la zona oscura del CG, sufrir el proceso de CSR y generar linfocitos B de memoria Sm y células plasmáticas de vida media larga que acabarán migrando a la médula ósea.

En modelos murinos está descrito que la cantidad de antígeno que presenten los linfocitos B del CG a las células Thf es proporcional al número de divisiones celulares

que sufren los linfocitos B y las SHM, de esta manera se explica que aquellos linfocitos B del CG que tengan mayor afinidad por el antígeno serán las que más se expandan ³².

El mecanismo de acción de *AID* consiste en un primer paso que introduce mutaciones puntuales en el ADN de doble cadena, deamina las citosinas (C) y las convierte en uracilos (U) en la región variable de la Ig en el caso de la SHM y en la zona S de la región constante de la cadena pesada de la Ig en la CSR. Esta mutación puntual genera una rotura en la hebra del ADN debido a que la enzima UNG retira el U y la endonucleasa APE1 crea un hueco en la hebra del ADN. Dicho hueco posteriormente será resuelto por la maquinaria de reparación/excisión del ADN y acabará fusionando los extremos de la hebra rota ^{35 36}.

El proceso de SHM iniciado por *AID*, genera linfocitos B con distintas afinidades por el antígeno, hay una expansión clonal de aquellos linfocitos con más afinidad que serán seleccionados positivamente, mientras que los linfocitos con menos afinidad se seleccionan negativamente y vuelven a sufrir varias rondas de SHM. Los linfocitos que siguen presentando baja afinidad del BCR, que sean autorreactivos o en los que las mutaciones puntuales hayan afectado a residuos importantes para la funcionalidad no serán seleccionadas y morirán por apoptosis. Por tanto, el proceso de SHM da lugar a maduración de la afinidad de la respuesta mediada por anticuerpos ³⁶. Una vez finalizado el proceso de SHM en la zona oscura del CG los linfocitos migran a la zona clara.

El proceso de recombinación para el cambio de clase (CSR) ocurre en la región constante de la Ig, pero se mantiene intacta la región variable para asegurar la especificidad y afinidad previamente adquiridas. Cada región constante de la cadena pesada consiste en una región promotora, seguida de una región no codificante, una región S y los exones de la cadena pesada μ , δ , γ , ϵ y α consecutivos. La región S consta de secuencias intrónicas ricas en repeticiones GC sobre las que *AID* actúa como se ha descrito anteriormente. Este proceso de cambio de clase CSR consiste en cambiar la región constante μ (IgM) por una de las otras regiones constantes, ya que inicialmente el exón de la región variable de la Ig se transcribe en asociación con el exón de la región constante μ y δ , por lo que en la membrana las células expresan IgM e IgD. Cuando la CSR sea a la región constante α dará lugar a la expresión de IgA, en el caso de la región constante γ a IgG y la región constante ϵ a IgE. Este cambio de clase está influenciado

por citoquinas, por ejemplo el interferón gamma (IFN γ) promueve el cambio a IgG2, la IL-4 facilita el cambio a IgE y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) a IgA³⁶.

Respuesta T independiente

Si el tipo de respuesta es T independiente se generan células de memoria IgM+, que suelen tener baja afinidad por el antígeno y que aparecen a los 3-4 días de la inmunización, pero que son capaces de diferenciarse rápidamente a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Estas células B de memoria generadas de manera T independiente, constituyen las que denominamos linfocitos B de memoria sin cambio de clase (USm). Desde hace algunos años se ha comprobado que efectivamente las células de memoria IgM+ (USm) que tengan mayor afinidad por el antígeno habrán llevado a cabo el proceso de SHM para la maduración de la afinidad y tendrán por tanto un origen en el CG aunque no hayan sufrido el CSR, mientras que las IgM+ de baja afinidad tendrán un origen independiente de la reacción del CG y también se denominan células de la zona marginal por su localización en los órganos linfoides secundarios³⁷³⁸. Estudios recientes han descrito que estas células de memoria IgM+ con origen primario independiente del CG, son capaces de reentrar en la reacción del CG en una segunda exposición al antígeno y lo mismo puede suceder con las células B de memoria Sm^{39 40}.

Formación de células plasmáticas

Las primeras células plasmáticas empiezan a generarse a los 14 días post inmunización y continúan generándose hasta 5 semanas después³⁸. La diferenciación hacia células plasmáticas requiere de la expresión de factores de transcripción específicos, el cese de la expresión de *BCL-6* condiciona la finalización de la reacción del CG. Por otro lado, *BCL-6* actúa como represor de Blimp-1 (codificado por *PRDM1*), que es imprescindible para la diferenciación a plasmáticas junto con los factores de transcripción *IRF4* y *XBPI*. Los plasmablastos son los que se producen primero, son de vida media corta, permanecen en circulación y dan lugar a la respuesta por anticuerpos temprana. Mientras que las células plasmáticas son de vida media larga y mediadores de

la respuesta inmune humoral duradera, residen en médula ósea donde se crean unos nichos o microambientes en los que son fundamentales la expresión de quimioquinas y se especula que factores como la IL-6 y APRIL (a través de su unión al receptor BCMA) sean los responsables de la supervivencia de estas células plasmáticas^{41 42 26}.

Otras subpoblaciones B

En algunas condiciones patogénicas, como en pacientes con IDCV, pacientes con infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y en algunas enfermedades autoinmunes, existe una expansión de una subpoblación B distinta, denominada CD21^{low}, por su baja expresión de CD21. Estas células no expresan CD38, pero sí IgM e IgD de membrana. Son células policlonales diferentes a las clásicas *Naive*, pero no son células de memoria puesto que no sufren la SHM. Son unas células predominantemente prevalentes en periferia, debido a que tienen menos expresión de dos citoquinas CXCR5 y de CCR7 que les facilita la migración a los órganos linfoides secundarios^{43 44}.

Activación y señalización intracelular del linfocito B

La señalización intracelular del linfocito B, comprende numerosas y complejas vías de activación intracelulares, que a partir de la señalización recibida por el BCR culminan en la activación de factores de transcripción clave para su diferenciación y activación, dichos factores de transcripción modulan la transcripción de genes implicados en supervivencia, activación y diferenciación, entre otras funciones, del linfocito B (Figura 3).

Los linfocitos B reconocen los antígenos gracias al BCR que está formado por la Ig de membrana, el heterodímero de CD79a y CD79b que contienen unas colas citoplasmáticas con los motivos ITAM (motivos de activación basados en inmunoreceptores de tirosina). El BCR está asociado a los correceptores que regulan positivamente la señal a través de CD21, CD19 y CD81. Y correceptores que regulan de forma negativa o inhibidores de la señal son el receptor Fc de la Ig (FcγRIIB) y la molécula CD22^{18 45}.

El inicio de la señalización por el BCR es a través de la fosforilación de las tirosinas de los motivos ITAM por tirosín kinasas de la familia Src, entre las que se encuentran Lyn, Fyn y Blk, esto hace que Syk se reclute cerca de los motivos ITAM. Syk a su vez fosforila, activa y recluta hacia el BCR a la proteína adaptadora BLNK y a Btk. Btk es la encargada de fosforilar y activar a la PLC γ 2 que escinde a PIP2 en diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato 1,4,5 (IP3). IP3 actúa como un segundo mensajero que facilita la salida del calcio (Ca²⁺) del retículo endoplasmático (RE) hacia el citoplasma. El aumento de Ca²⁺ intracelular activa a otras moléculas como la proteína kinasa C (PKC) y las proteínas MAP kinasas como p38 y JNK^{46 47 48}. El DAG por su parte activa a la protein kinasa C de los linfocitos B (PKC β), que a su vez activa a *CARMA1* que forma parte un complejo junto con *BCL-10* y *MALT1*, este complejo media la señalización canónica de NF κ B a través IKK, que fosforila al inhibidor IK β , facilitando así la translocación del factor de transcripción NF κ B al núcleo⁴⁹.

La activación del BCR también conlleva a la activación de PI3K que promueve la movilización de Ca²⁺ y acaba activando al factor de transcripción NF κ B. La activación de PI3K es fundamental para la proliferación y supervivencia de las células B, ligado a la actividad de PI3K se encuentran las kinasas Akt que fosforiladas promueven la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis⁵⁰. Akt se activa por fosforilación mediada por PDK1 y el complejo mTOR2, y así es capaz de iniciar la fosforilación de una serie de sus sustratos. Akt tiene múltiples dianas como la proteína ribosomal S6, que también se activa por PDK1 y el complejo mTOR1. Tanto Akt como S6 son dos de los intermediarios de la compleja cascada de señalización del linfocito B⁵¹. En concreto la activación de estas dos proteínas está mediada por fosforilación. Akt fosforilada promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis. Mientras que la proteína ribosomal S6, forma parte de la subunidad ribosomal 40S y pertenece a la familia S6K de proteínas ribosomales. La proteína S6 se activa por fosforilación y participa diversos procesos como en la traducción de ARNs ribosomales y factores para la elongación peptídica y otras proteínas implicadas en la entrada y progresión del ciclo celular⁵². S6 promueve la supervivencia celular también inhibiendo la apoptosis⁵³.

Otras de las dianas de Akt son los factores de transcripción FOXO, que están unidos a promotores de genes implicados en proliferación y supervivencia. La activación de los linfocitos B activa como se ha descrito a PI3K y Akt, Akt activado

fosforila a las proteínas Foxo que serán degradadas en el citoplasma y así hay progresión del ciclo celular. Este eje regulatorio también está implicado en la reacción del CG, de manera que cuando la señalización es muy activa porque el antígeno sea redundante o hay mucha afinidad, los niveles de Foxo están reducidos y se promueve la diferenciación rápida hacia células plasmáticas IgM⁺ formadoras de anticuerpos. Mientras que cuando la afinidad o la redundancia del antígeno es intermedia, se necesitan formar células de memoria más especializadas, por lo que se facilita la reacción del CG y el CSR para generar anticuerpos de muy alta afinidad ^{50 54 55}.

El linfocito B además del BCR, tiene otros receptores de superficie que están también implicados en su activación y supervivencia. BAFFR junto con TACI y BCMA son receptores que tras la unión de sus ligandos BAFF y APRIL transmiten señales de supervivencia al interior del linfocito B. La señalización generada a través de BAFFR acaba activando la vía no canónica de NFκB y este factor de transcripción facilita la transcripción de genes antiapoptóticos como *BCL-2* y *BCL-XL* ⁵⁶. Además BAFFR es uno de los factores implicados en la señalización tónica del BCR que favorece la supervivencia de los linfocitos no autorreactivos, para que salgan de médula y acaben diferenciándose a células inmaduras y posteriormente *Naive* ^{57 58 59 60}.

Otro importante regulador de la supervivencia B es la vía de señalización de NFκB, el nexo que convierte las señales extracelulares en intracelulares y promueve su crecimiento y supervivencia; La familia de NFκB consta de diferentes subunidades, NFκB1 (p105/p50), NFκB2 (p100/p52), Rel A (p65), Rel B y c-Rel. NFκB1 y NFκB2 se sintetizan como precursores p105 y p100 para ser procesados a p50 y p52. NFκB1 forma parte de la llamada vía clásica o canónica que se activa en respuesta a señales inflamatorias y depende de la transducción de la señal por el complejo formado por *CARMA1*, *BCL-10* y *MALT1*, permitiendo la translocación al núcleo de NFκB1. Y la llamada vía alternativa o no canónica que se activa por la señalización recibida por BAFFR y CD40 y que a través de kinasas hace que p100 se procese a p52 y sea esta última la que se transloque al núcleo formando un dímero p52-Rel B ^{61 62}.

Supervivencia y apoptosis en los linfocitos B

Entre los múltiples genes que NF-κB modula su transcripción, están como ya se ha mencionado anteriormente algunos miembros de la familia Bcl-2. La apoptosis es un proceso esencial en el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune. Durante los

primeros estadios de linfopoyesis, el proceso de apoptosis regula la supervivencia de los progenitores, durante la diferenciación se encarga de eliminar los linfocitos autorreactivos, muchos de estos controles de muerte celular están regulados por la familia de proteínas de Bcl-2 ⁶⁰. Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 son proteínas integrales de membrana localizadas en la mitocondria, RE y membranas nucleares. La mayoría de proteínas proapoptóticas están localizadas en el citosol, pero por una señal de muerte pueden sufrir un cambio conformacional que les permita integrarse en la membrana externa de la mitocondria y actuar como proteínas proapoptóticas ⁶³.

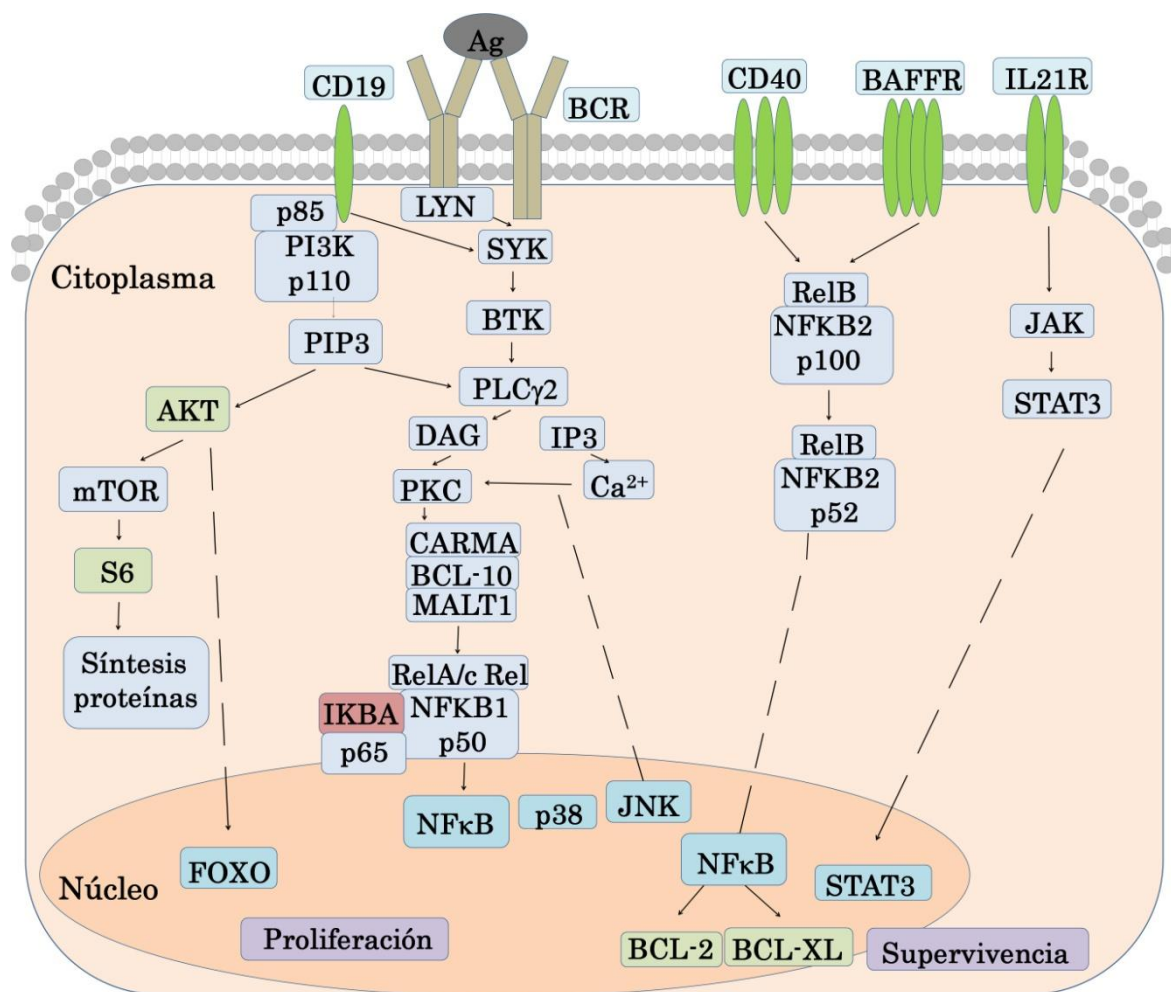


Figura 3: Principales vías de señalización intracelular del linfocito B.

La supervivencia de las células y los procesos replicativos requieren inhibición de la apoptosis. Gracias a la recepción de señales y activación de diferentes receptores en la superficie del linfocito B hace que se transmitan las señales de supervivencia

desde la superficie celular al núcleo a través de la vía PI3k/Akt ⁶⁴. Una de las subunidades de NF-κB, c-Rel regula el promotor del gen *BCL-XL*, por lo que hay una participación directa de NFκB en el control de la activación del factor antiapoptótico *BCL-XL* ⁶⁵. La señalización mediada por BAFF-BAFFR activa la expresión de Akt y CD21, de esta forma se disminuye el umbral de activación de la señalización por el BCR y hay un efecto neto de activación así como de NFκB dando lugar a la expresión de genes antiapoptóticos en células B maduras. De igual manera la cooperación de las células B y T (CD40-CD40L) puede activar tanto la vía canónica como la no canónica de NFκB favoreciendo la expresión de genes antiapoptóticos como *BCL-XL* ⁶⁶.

El número de células efectoras que pueden generarse a partir de células *Naive* es variable, aquellas que dejen de recibir prematuramente las señales, morirán por apoptosis y no se diferenciarán a otras subpoblaciones. Mientras que las células *Naive* que sigan recibiendo señales de supervivencia, siguen proliferando y diferenciándose a otras subpoblaciones efectoras ⁶⁷.

La relevancia de la familia Bcl-2 en distintos estadios madurativos fue descrita hace algunos años en ratones ⁶⁸, en los estadios de médula ósea se necesita un correcto equilibrio en la expresión de Bcl-2 para que se permita la edición del receptor en células potencialmente autorreactivas, si no lo consiguen no se las permitirá sobrevivir. Mientras que durante la reacción del CG la expresión de Bcl-2 es baja debido a que las células durante el fenómeno de SHM pueden sufrir errores y las que no cumplan con los criterios de calidad deben morir por apoptosis; sin embargo en la zona clara del CG sí que se incrementa la expresión de Bcl-2 para rescatar a todas los linfocitos B que tengan suficiente afinidad por el antígeno ⁶⁹.

Alteraciones inmunológicas descritas en la IDCv

Los pacientes con diagnóstico de IDCv, pueden presentar desde números normales de linfocitos B en sangre periférica hasta número muy reducidos. Prácticamente todos los pacientes presentan una casi completa ausencia de células plasmáticas formadoras de anticuerpos y reducción variable de linfocitos B de memoria. El fenotipo B que presentan es por tanto, un reflejo del bloqueo madurativo. Los análisis de la frecuencia con la que ocurren la SHM y el número de divisiones celulares

Las células *Naive* para sobrevivir necesitan ser activadas por un antígeno para prevenir las de la apoptosis. En general las células *Naive* de los IDCV tienen una mayor tasa de apoptosis espontánea y una mayor expresión de Fas (CD95) que debe ser el resultado de una activación crónica debido a las continuas infecciones y la disregulación del sistema inmune. El aumento de la apoptosis en linfocitos T y B pueden estar implicados en la linfopenia que presentan algunos pacientes, el número elevado de células inmaduras, la reducción de las células B maduras circulantes y el defecto en la producción de Igs ⁷².

Las células B de memoria en los pacientes con IDCV son más sensibles a morir por apoptosis que las *Naive* en ausencia de estímulos. La activación de los linfocitos B con CD40L y citoquinas como IL-4 e IL-21 reducen significativamente la apoptosis de los linfocitos B *Naive* y de memoria de la IDCV. Sin embargo, en aquellos pacientes con disminución de células B de memoria, estas células son menos sensibles al rescate por apoptosis que proporciona CD40L y CpG (y es independiente de IL-21). La IL-21 además es capaz de restaurar *in vitro* la producción de Igs en pacientes IDCV ^{73 74 75}.

Recientemente se ha descrito la alteración en la activación canónica de NFκB en los pacientes con IDCV, degradan menos IκBα, el inhibidor de NFκB, por lo que tras activación de linfocitos B *Naive* con anti IgM, no se permite la activación de NFκB como en linfocitos B de controles sanos y hay una menor fosforilación y menor translocación de la subunidad p65 al núcleo. Estos defectos son más severos en un subgrupo de pacientes con IDCV con expansión de la subpoblación CD21*low*. En este artículo también quisieron testar la expresión de IκBα y Bcl-xl dos de las proteínas inducibles por NFκB, constando igualmente un menor incremento en los pacientes con IDCV ⁷⁶.

La subpoblación B de linfocitos CD21*low* expandida en algunos pacientes con IDCV tienen un fenotipo exhausto debido probablemente a la activación que sufren en periferia y a que se dividen más veces que los linfocitos B *Naive*. Dicha población CD21*low* no son exactamente células anérgicas, puesto que son capaces de aumentar la expresión de marcadores de activación tras estimulación ⁴⁴.

Los linfocitos B *Naive* y de memoria de los pacientes con IDCV, presentan unos niveles constitutivos de Erk fosforilados elevados en comparación con controles sanos.

Sin embargo, la inducción de la fosforilación de Erk tras activación destaca defectos en dicha capacidad de incrementar los niveles de fosforilación en las células B de memoria IgM⁺. Y esto vuelve a ser destacable sobre todo en los pacientes con expansión de linfocitos B CD21^{low}, también se ha constatado que en las células de memoria IgM⁺ hay una disminución en la endocitosis del BCR, de forma más abrupta en pacientes con expansión de CD21^{low} ⁷⁷.

Se han descrito defectos en la IDCV asociados a la señalización por receptores de tipo Toll (TLR), en concreto el TLR9 se expresa en linfocitos B de memoria y se une a CpG no metiladas, un ligando para reconocer bacterias; los pacientes con IDCV presentan una reducción en la expresión de TLR9 ^{78 79}. Del mismo modo, se han descrito alteraciones en las células dendríticas que deben activar y hacer proliferar a los linfocitos T responsables de la ayuda que proporcionan a los linfocitos B. Las células dendríticas de los pacientes con IDCV presentan menos CD1a y tienen menos capacidad para activar a los linfocitos T en comparación con controles sanos ⁸⁰. Una población de células T innatas derivadas del timo y denominadas iNKT que supone una población minoritaria, aparece muy reducida en algunos pacientes con IDCV. Estas células producen varias citoquinas como la IL-17, en los pacientes que presentan menos iNKT, tienen menor producción de IL-17 y menos linfocitos Sm que se asocia con una mayor tendencia a la linfoproliferación ⁸¹.

En cuanto al fenotipo T, se ha descrito que el aumento de linfocitos CD8⁺ y la característica inversión del cociente CD4⁺/CD8⁺, puede ser atribuible a la infección por citomegalovirus (CMV), así como una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias que pueden contribuir a la enfermedad inflamatoria presente en algunos pacientes con IDCV ⁸². La expansión de linfocitos T CD8⁺ suele ir acompañada de la reducción de linfocitos T CD4⁺ que habitualmente presentan los pacientes con IDCV, así como mayor expresión de CD95 y por tanto, mayor tasa de apoptosis espontánea ^{83 84 85}. Las alteraciones del compartimento T están asociadas con la presentación clínica más severa y mayor número de complicaciones, las clasificaciones más recientes de criterios diagnósticos de IDCV, excluyen precisamente para el diagnóstico aquellos pacientes con reducción severa de linfocitos T CD4⁺ y que hayan sufrido enfermedades por oportunistas y se denomina inmunodeficiencia combinada de debut tardío (LOCID) ^{1 2} ⁸⁶. Por otro lado, recientemente se ha descrito que los pacientes con IDCV tienen más linfocitos Tfh que los controles y que esta proporción es aún mayor en pacientes que

presentan complicaciones autoinmunes y granulomas, asociando dichas complicaciones al aumento de este tipo celular ⁸⁷.

Los pacientes con IDCV presentan niveles de BAFF elevados, pero niveles reducidos del receptor BAFFR, se sabe que hay una regulación entre los niveles de ligando y del receptor. Se especula que las alteraciones en dichos niveles en la sangre de los pacientes con IDCV, pueden estar contribuyendo aún en ausencia de mutaciones a la patogénesis de la IDCV ⁸⁸. También se han descrito anomalías en la longitud de los telómeros de linfocitos T y B de pacientes diagnosticados de IDCV, especialmente los pacientes que presentan expansión de CD21^{low}, presentan una longitud menor de los telómeros en todas las subpoblaciones B y T ⁸⁹. Una posible explicación a este fenómeno puede deberse a los defectos de la señalización por Ca²⁺ en los pacientes con expansión de células CD21^{low}, aunque los niveles reducidos de señalización por Ca²⁺ son generalizados tras estimular el BCR con anti IgM en los paciente, dicha reducción es más acusada en pacientes que presentan expansión de células CD21^{low}. La reducción del flujo de Ca²⁺ en este subgrupo de pacientes, según algunos autores puede deberse a la mayor expresión de CD22, que es un regulador negativo del flujo de Ca²⁺. Otros autores relacionan el defecto en la señalización por Ca²⁺ con una menor capacidad de los linfocitos B de los pacientes tras la activación del BCR, de disociar e internalizar el BCR, mientras que CD20 se queda en la membrana ^{90 91}.

También se ha descrito un aumento en la expresión de IFN γ y de genes relacionados con su señalización, tras estudiar el perfil transcripcional en pacientes con IDCV con complicaciones inflamatorias, por lo que la alteración de la inmunidad adaptativa descrita en la IDCV puede dar lugar a la activación crónica de las vías innatas del IFN γ ⁹².

Mecanismos epigenéticos

Definición Epigenética

El término Epigenética se describió por primera vez como la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, que da lugar al fenotipo ⁹³. La epigenética es el estudio de los cambios heredables que afectan a la función de los genes sin que haya un cambio en la secuencia del ADN ⁹⁴. Las principales marcas epigenéticas son la metilación del ADN, las modificaciones post-transcripcionales de histonas y los ARN de pequeño tamaño no codificantes (microARNs) ^{94 95}. Los cambios epigenéticos por susceptibilidad genética y exposición ambiental pueden modular la expresión génica y alterar las funciones celulares sin alterar las secuencias genómicas ²¹. El epigenoma de la célula es variable y va cambiando según el estado de diferenciación de las células, se trata de un proceso dinámico que regula la transcripción génica en respuesta a una gran variedad de estímulos ⁹⁶. La accesibilidad de los factores de transcripción a las zonas regulatorias de los genes es necesaria para promover o impedir su transcripción, que a su vez está regulado de manera local por el estado de la cromatina que facilite o no la unión de dichos factores de transcripción ⁹⁷.

La maquinaria epigenética es importante en la diferenciación de las diferentes células del sistema hematopoyético, incluyendo las células B. Las marcas epigenéticas son inducibles en los linfocitos B y controlan programas transcripcionales que llevan a cabo los cambios moleculares necesarios para que los linfocitos B se diferencian para llegar a formar las células productoras de anticuerpos ^{21 98}. La desregulación de las células B por expresión aberrante de ARN no codificantes, modificaciones de histonas y metilación del ADN puede dar lugar a respuestas alteradas de anticuerpos frente a antígenos ²¹.

microARNs: biogénesis y función

Los microARNs son reguladores post-transcripcionales de la expresión génica ⁹⁹. Son moléculas de ARN no codificantes de pequeño tamaño (19-23 nucleótidos). La actividad de los microARNs sobre sus ARN mensajeros (ARNm) diana, está basado en la complementariedad parcial de bases con la región 3'UTR del ARNm diana, cuando

esto sucede provoca la desestabilización de los mismos, teniendo como consecuencia una reducción de los niveles de traducción de proteína y/o en la estabilidad del ARNm (Figura 5). Un solo microARN puede tener complementariedad con varios cientos de dianas. Tsai et al, hipotetizan que las dianas en los transcritos de genes con pocos sitios de unión para microARN en la región 3'UTR tienen una inhibición más eficiente que aquellos transcritos con más sitios de unión para microARN^{99 100 101}.

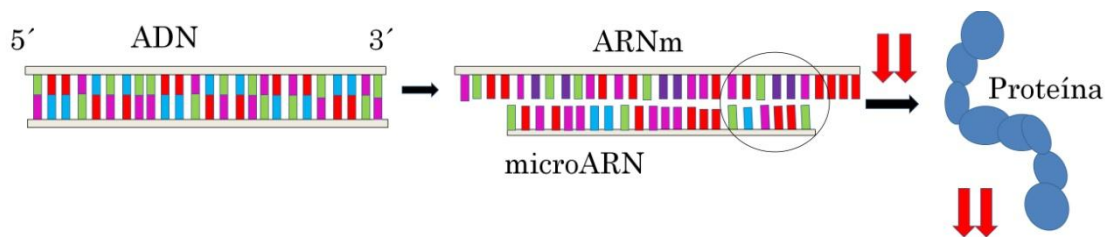


Figura 5: Los microARNs se pueden unir a los ARNm a través de complementariedad parcial de 6-8 nucleótidos, de esta manera los microARNs pueden desestabilizar o degradar los ARNm que se traduce en una disminución de los niveles de proteína.

Los niveles de los microARNs maduros en la célula dependen de su propia tasa de transcripción, la eficiencia del procesamiento a microARN maduros y el transporte activo que haya entre las células adyacentes y su estabilidad¹⁰².

Los microARNs se procesan como ARNs de tamaño más largo por la ARN polimerasa III, este primer microARN (pri-microARN) es reconocido por una proteína de unión llamada DGCR8 y procesado por la proteína Drosha. El precursor del microARN (pre-microARN) es exportado al citosol por la proteína Exportina y ya en el citoplasma la enzima Dicer genera un microARN maduro de doble cadena con un tamaño aproximado de 19-25 nucleótidos. Finalmente en el complejo RISC se seleccionarán una de las dos cadenas del microARN. En este complejo RISC será donde el microARN se unirá a su ARNm diana a través de 6-8 nucleótidos complementarios en la región 3'UTR del ARNm diana¹⁰³.

Relevancia de microARNs en la diferenciación del linfocito B

Los microARNs regulan la expresión génica en diferentes estadios de la diferenciación B, regulando la expresión de proteínas, interfiriendo en la degradación o represión translacional de los ARNm que codifican para dichas proteínas. El hecho de

cada microARN pueda tener como dianas múltiples ARNm, así como que cada ARNm tenga varios potenciales microARNs que lo regulen, hace que se cree una red de regulación muy compleja ¹⁰⁰. La expresión alterada de los microARNs tiene consecuencias en procesos de diferenciación, proliferación, CSR, SHM entre otros, que pueden comprometer la correcta funcionalidad de los linfocitos B.

La implicación de los microARNs se ha descrito en distintos estadios madurativos de la célula B. Los modelos de ratón deficientes para la enzima Dicer presentan un bloqueo en la diferenciación B entre los estadios pro B y pre B, demostrando que los microARNs son esenciales en todas las etapas de diferenciación B. Los modelos murinos *in vitro* destacan por ejemplo, que en médula ósea el aumento del microARN-125 (miR-125) compromete la diferenciación entre los estadios de precursores linfoides y el estadio pre B. Justo entre los siguientes estadios pre B y pro B el aumento de expresión de miR-181a, miR-34a y el grupo de microARNs llamado 17-92 limitan la diferenciación de los linfocitos B entre estos estadios ^{102 104 105}.

Se ha demostrado por estudios en modelos murinos de pérdida y ganancia de función, la implicación de varios de microARNs en la reacción del CG como miR181b, miR-125b, miR-155 y miR-217. En el estadio de diferenciación de células B *Naive* que entran en la reacción del CG, la decisión si proseguir un tipo de respuesta CG independiente como hacen las llamadas células foliculares parece estar influenciado por la expresión de miR-185 ^{102 104}.

Los niveles de AID también parecen estar regulados por varios microARNs como miR-155, miR-181b, miR-361 que reducen tanto los niveles de ARNm como de proteína. En concreto para miR-181b se ha demostrado en un modelo de ratón en el que se delecciona el sitio de unión de miR-181b en la región 3'UTR de AID, que provoca un aumento de los niveles de AID, y que tiene consecuencias relevantes como el incremento de las translocaciones cromosómicas asociadas a linfomas B ¹⁰⁶.

Otro potente regulador de la reacción del CG es miR-155, su expresión es elevada tanto *in vivo* como *in vitro* en células del CG de ratón. MiR-155 es importante para la diferenciación de células T y células dendríticas, pero se ha demostrado su implicación específica en las células B, puesto que su pérdida de expresión en modelos murinos reduce las respuestas del CG y la producción de anticuerpos IgG1. Sin embargo, *BCL-6* el represor necesario para la reacción del CG, puede a su vez reprimir

a miR-155b y miR-361, de esta manera *BCL-6* regula positivamente la expresión de *AID*^{107 108}.

Los microARNs también intervienen en el establecimiento de la tolerancia, la delección de la enzima Dicer en poblaciones B maduras, hacen que exhiban un repertorio del BCR con tendencia hacia la autorreactividad, con un gran cantidad de autoanticuerpos¹⁰⁹. Se ha descrito la implicación tanto en modelos de lupus eritematoso sistémico como en pacientes con la enfermedad, de miR-21 y miR-15a en la regulación de anticuerpos autorreactivos¹⁰⁴. En numerosas malignizaciones de tipo B se ha descrito la desregulación de microARNs, por ejemplo en Linfoma No Hodking (LNH) hay una mayor expresión de miR-155, miR-17-92 y miR-21 pero disminución de otros como miR-181 y miR-34a¹¹⁰. Estudios de sobreexpresión de microARNs como miR-217 expresados en células del CG ya habían puesto de manifiesto su posible implicación en malignizaciones, recientemente se ha encontrado que también está sobreexpresado in vivo en linfomas B humanos.

Por tanto, queda de manifiesto la implicación de las funciones de los microARNs en patologías de la célula B como autoinmunidad y cáncer. Sin embargo, hasta el momento el estudio de la expresión de microARNs en la IDCv permanecía inexplorado.

Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de las citosinas¹¹¹. Esta metilación está mediada por la familia de enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs), y se produce generalmente en los dinucleótidos CpG¹¹². Las DNMT3A y DNMT3B dan lugar a la metilación del ADN *de novo*, mientras que DNMT1 es la encargada de mantener el patrón de metilación durante las sucesivas divisiones celulares⁹⁵. La presencia de islas CpG en la región promotora de los genes, zonas adyacentes o en *enhancers*, está asociado con represión génica, debido a que la metilación interfiere con la accesibilidad y el reclutamiento de factores de transcripción a la secuencia del ADN (Figura 6) y también porque en las islas CpG se pueden reclutar los dominios de unión de CpG metiladas (MBD) que favorecen un cambio conformacionales que compacta la cromatina e inhibe la transcripción génica^{95 111 113}.

La metilación del ADN se asocia con el control de la expresión génica de diferentes maneras, dependiendo de la localización de las CpGs y el contexto en el que se encuentre la cromatina. La metilación del ADN se suele asociar con represión génica, mientras que la hipometilación del ADN tiene el efecto contrario (Figura 6). En el sistema inmune hay cambios en los patrones de metilación a lo largo de la diferenciación, por ejemplo en el linaje linfocitario, que necesita dar lugar a células efectoras especializadas ¹¹⁴.

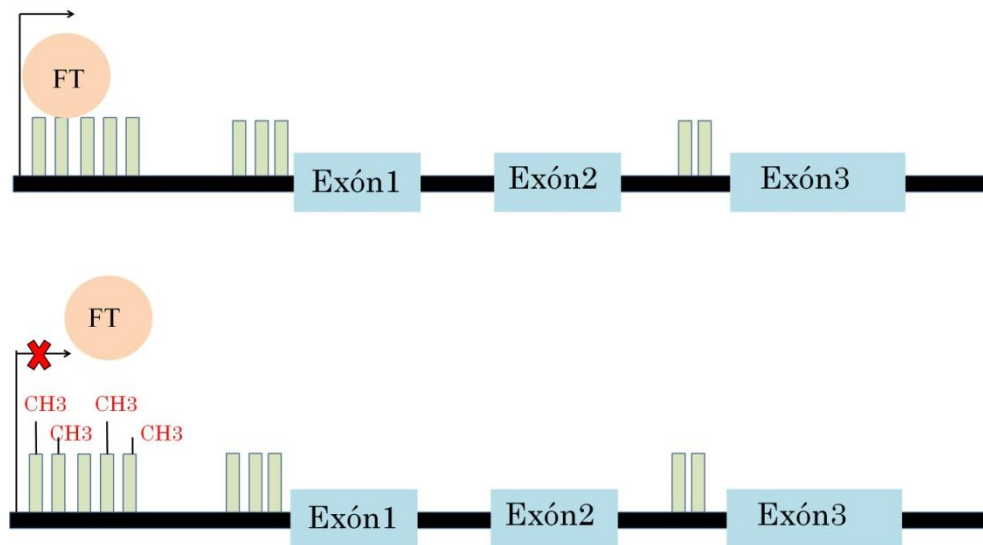


Figura 6 Efecto de la metilación del ADN en zonas promotoras sobre la transcripción: Los dinucleótidos CpG susceptibles de metilación suelen localizarse agrupados en las llamadas islas CpG en las regiones promotoras, regiones adyacentes o zonas de unión de *enhancers*. La metilación del ADN en dinucleótidos CpG está asociado con silenciamiento, la metilación reduce la disponibilidad de los sitios de unión a los factores de transcripción (FT) y modifica la estructura de la cromatina dificultando la unión de la maquinaria de transcripción. (Adaptado de Portela et al, 2010 ⁹⁵).

Metilación del ADN e implicación en la diferenciación del linfocito B

Durante los primeros estadios de diferenciación en médula ósea, desde los progenitores a las células pre B existe una desmetilación del ADN que se asocia con el incremento de expresión de factores de transcripción como E2A, EBF y Pax 5 ^{115 116}. Aunque cada subpoblación B tiene su propio patrón de metilación, existe la llamada memoria epigenética, que se encarga de mantener la hipometilación de dichos factores de transcripción en subpoblaciones B más diferenciadas ¹¹⁶. Pax 5 es un factor de transcripción importante para establecer el compromiso con el linaje B, activa a CD19 cuyo promotor se activa después de la unión de Pax5. Pax 5 además impide la transcripción de otros factores implicados en otros linajes.

En HSC el gen *mb-1* que codifica para la subunidad α de la Ig ($Ig\alpha$) del pre BCR está metilado, pero la acción de EBF desmetila este gen durante el desarrollo B y facilita la unión de Pax5^{113 117}. Pax 5 también regula la accesibilidad de las RAGs a los segmentos V(D)J quitando marcas de histonas represivas¹¹⁸, en concreto los genes activados por Pax 5 están enriquecidos en marcas de histonas permisivas^{98 113}.

Después del reordenamiento del BCR en médula ósea, los linfocitos B irán a los órganos linfoides secundarios para encontrarse con el antígeno y llevar a cabo la reacción del CG y los procesos de SHM y CSR²⁰. Las células *Naive* están caracterizadas por tener niveles de metilación del ADN altos pero presencia de histonas hipoacetiladas. El gen *AID* solo se expresa después de la activación de los linfocitos B, en células *Naive* *AID* está reprimido por metilación, pero progresa hacia los siguientes estadios de diferenciación desmetilando su promotor, además de la presencia de histonas permisivas que facilitan la apertura de la cromatina^{107 119}. Durante los procesos de SHM y CSR es necesario la hipometilación del ADN, asociado con marcas de histonas permisivas, tanto para el inicio de estos procesos como para el correcto funcionamiento de *AID*, que por su parte también favorece la acetilación de histonas durante la CSR¹¹².

Durante la reacción del CG las linfocitos B sufren una alta tasa de replicación y una desmetilación masiva¹¹⁶. El estudio de los patrones de metilación de células *Naive* y de linfocitos B del CG muestran programas epigenéticos muy distintos. Sin embargo, desde linfocitos B del CG a linfocitos B de memoria, comparten unos patrones de metilación más parecidos. Los linfocitos B de memoria y las células plasmáticas tiene hipometilación predominante en la regiones de heterocromatina y una más escasa hipermetilación en las regiones reguladas por el complejo *polycomb* (complejos que median la modificación H3K27me3 y H2AUb en las histonas). Los cambios de metilación que se observan en los estadios más tardios de la diferenciación están asociados con la vida media más larga de estas subpoblaciones B de memoria y plasmáticas^{116 120}.

La desmetilación del ADN generalizada durante la activación no siempre se correlaciona con expresión génica, pero la dinámica de los elementos regulatorios en las CpG modulan la expresión génica durante la diferenciación B. La pérdida de metilación desde las células *Naive* a los linfocitos del CG permite a estos últimos terminar de

diferenciarse a células B de memoria o plasmáticas que tienen la capacidad de generar respuestas antigénicas específicas ^{116 120}. En la transición desde linfocitos B *Naive* a linfocitos B de memoria la mayoría de genes con diferente expresión están asociados con funciones como activación linfocitaria, crecimiento, proliferación, supervivencia y muerte. Caron *et al* ¹²¹ partiendo de linfocitos *Naive* que activan *in vitro* observan la reconfiguración de la expresión génica y epigenética que conlleva una pérdida de metilación. Esta pérdida progresiva de metilación parece ser dependiente del ciclo celular y del número de divisiones celulares que acumulen. Caron *et al*, sostienen que la fase S del ciclo celular puede ser el momento idóneo para remodelar la cromatina y que sucedan los cambios transcripcionales necesarios para diferenciarse a células plasmáticas ^{121 122}.

Alteraciones en la metilación del ADN en linfocitos B IDCv

En el año 2015 describimos por primera vez, alteraciones en la metilación del ADN en linfocitos B de pacientes diagnosticados de IDCv ¹²³. En dicho estudio previo partiendo de una pareja de gemelos monozigóticos discordantes para la IDCv analizamos más de 450.000 CpGs linfocitos B totales (CD19⁺) encontrando 311 CpGs con diferente metilación entre los hermanos, la mayoría de las CpGs (230) estaban hipermetiladas en el gemelo afecto y 81 CpGs estaban hipometiladas. Después de realizar un análisis de ontología de genes, seleccionamos las CpG en los genes más relevantes asociados a la biología de los linfocitos B, como *PIK3CD* que es la subunidad catalítica de una de las isoformas de PI3K que transmite las señales del BCR y activa numerosos efectores, incrementa los niveles de calcio intracelular y entre otros activa a Akt (se selecciona para el análisis *AKT3*) que a su vez media la activación del complejo mTORC que fosforila y activa a la kinasa S6 (*RPS6KB2*) también incluido entre las CpG con diferente metilación seleccionadas. Se seleccionaron también dos canales de potasio (K⁺) *KCNN4* y *KCNC4* implicados en mantener elevados los niveles de Ca²⁺ intracelular a través de la movilización de K⁺. Además se escogieron para validar dos CpG con diferente metilación en *BCL-XL* y el factor de transcripción E2A codificado por *TCF3*.

Para validar las diferencias de metilación encontradas en la pareja de gemelos, aislamos subpoblaciones B *Naive*, USm y Sm en 16 pacientes con IDCv y 12 donantes

sanos para analizar el estado de metilación de las CpG seleccionadas por pirosecuenciación con bisulfito. Los resultados que obtuvimos, nos permitieron identificar que en controles sanos había una pérdida progresiva de metilación en la transición de linfocitos B *Naive* a linfocitos Sm en las CpG seleccionadas de los genes *TCF3*, *PIK3CD*, *KCNN4*, *KCNC4*, *BCL2L1*, *RPS6KB2* y *CORO1B*. Sin embargo, en los pacientes con IDCV aunque presentaban unos niveles de metilación muy parecidos a los controles en los linfocitos B *Naive*, presentaban un defecto en la desmetilación hacia la transición de linfocitos B de memoria, siendo especialmente elevados los niveles de metilación en las células Sm.

Esta alteración en la metilación de las CpG seleccionadas era específica de linfocitos B, era independiente de los niveles globales de las DNMT3a y DNMT3b, las enzimas encargadas de la metilación *de novo*, así como de los niveles de TET2 la enzima encargada de retirar la metilación. Por Q-PCR se comprobó que la desmetilación del ADN estaba relacionada con la ganancia de expresión de los ARNm en los genes *BCL2L1*, *KCNC4* y *CORO1B* en la transición desde linfocitos *Naive* a Sm de controles sanos. Así como un aumento de la presencia de la histona permisiva o activadora H3K4me3 durante la diferenciación de *Naive* a Sm en genes como *BCL2L1* y *PIK3CD* en controles sanos.

Se trata del primer estudio que demostró alteraciones epigenéticas en la IDCV, se describió la incapacidad de los linfocitos B de los pacientes con IDCV de desmetilar algunos genes en la transición de células *Naive* a células Sm, probablemente influenciados por el ambiente que da lugar al debut de la IDCV, o bien que otras causas que provocan el desarrollo de la IDCV y las alteraciones que observamos en la desmetilación del ADN sean manifestaciones de una función deficiente de los linfocitos B.

La finalidad de la presente tesis doctoral es tratar de entender los mecanismos alterados que ocurren durante la diferenciación del linfocito B en la Inmunodeficiencia Común Variable, tanto desde un punto de vista de señalización intracelular y de supervivencia de los linfocitos B, como desde nuevas aproximaciones, algunas hasta ahora inexploradas, en el contexto de la Inmunodeficiencia Común Variable, de modificaciones epigenéticas, en concreto microARNs y metilación del ADN.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es una enfermedad compleja y heterogénea. A pesar de considerarse una inmunodeficiencia primaria no se ha identificado claramente una base patogénica monogénica. El rasgo común a todos los pacientes es un cierto grado de alteración del compartimento B. Una posibilidad es una base genética heterogénea de predisposición, junto con errores moleculares acumulados en el linfocito B que puedan conducir al deterioro de la formación de anticuerpos y desembocar en el debut clínico.

La alteración de la diferenciación, supervivencia y activación del linfocito B en la IDCV, podría deberse a defectos en vías de señalización, que conllevan a la activación de NFκB y a mecanismos epigenéticos de control de la transcripción génica, hasta ahora no explorados que pueden estar implicados en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad.

Objetivos

El objetivo general es describir posibles defectos moleculares acumulativos a nivel de señalización intracelular y a nivel epigenético en los linfocitos B de pacientes con IDCv, que pudieran tener un papel patogénico en la alteración de su diferenciación y supervivencia y, que permitan entender la naturaleza variable y de instauración progresiva de la enfermedad.

El objetivo general se conseguirá en base a los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión de proteínas antiapoptóticas en las subpoblaciones B y el estudio de la capacidad de las células *Naive* activadas de forma T dependiente (CD40L e IL-21) en incrementar ARNm de la familia de Bcl-2.
2. Detectar posibles alteraciones en la señalización intracelular dependiente del BCR, mediante el análisis de la fosforilación mediada por activación del BCR en las proteínas Akt y S6 en subpoblaciones B.
3. Explorar nuevos mecanismos postransduccionales, microARNs, que puedan estar interviniendo en la alteración del compartimento B descrito en la IDCv.
4. Analizar la metilación del ADN en las subpoblaciones B (*Naive*, memoria sin cambio de isotipo y memoria con cambio de isotipo) en pacientes con IDCv, en genes de especial relevancia para el desarrollo, diferenciación y activación de las células B.

Materiales y **métodos**

Materiales y métodos

Base de datos clínicos y recogida de muestras de los pacientes

Los datos clínicos de los pacientes han sido recogidos durante las visitas rutinarias a la consulta de Inmunología del Hospital Universitario La Paz.

La recogida de muestras se ha llevado a cabo mediante la extracción de tubos extra previo consentimiento informado, en las analíticas de seguimiento, en la consulta de Inmunología o bien durante el momento previo a la infusión con gammaglobulina intravenosa en el Hospital del Día del Hospital Universitario La Paz.

En total para los diferentes experimentos se han incluido 57 pacientes diagnosticados de IDCV y controles donantes sanos (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución del número de pacientes incluidos en los diferentes estudios realizados.

Estudio realizado	Nº pacientes	Nº Controles
Análisis del fenotipo B en sangre periférica	57	
Análisis de la proteína antiapoptótica Bcl-2	43	41
Análisis de la proteína antiapoptótica Bcl-xl	37	27
Análisis niveles totales de las proteínas intracelulares Akt y S6	25	19
Análisis fosforilación in vitro con anti IgM de las proteínas Akt y S6	18	11
Activaciones <i>in vitro</i> de células Naive+CD40L+IL-21 y análisis expresión ARNm	20	16
Array expresión microARNs	13	3
Validación microARNs	14	11
Análisis metilación ADN	22	16
Estudio del número de divisiones celulares (KREC)	22	16
Frecuencia de las hipermutaciones somáticas	22	16

Los pacientes incluidos están diagnosticados de IDCV y presentan en sangre periférica números de linfocitos B en periferia superiores al 1% sobre el total de linfocitos. Los pacientes de cada grupo experimental presentan frecuencias muy similares tanto en complicaciones clínicas como en el fenotipo con respecto al conjunto global de pacientes.

Los controles sanos analizados tienen una distribución en cuanto a sexo y edad muy similares a los pacientes (Tabla 2). La mayoría de los controles sanos han sido obtenidos de dos fuentes de donantes, una anónima para la rutina diagnóstica de pruebas de laboratorio (no disponemos de datos de sexo y edad) y otra de donantes que conocemos sexo y edad. Otra parte de los controles sanos para los estudios de metilación y microARNs son donantes sanos conocidos de los que hemos requerido muestras en extracciones sucesivas en el tiempo.

Tabla 2: Características sexo y edad de los pacientes y controles analizados en los diferentes experimentos (* sólo contabilizados los controles de los que disponemos de datos de sexo y edad).

	Mujer IDCV	Hombre IDCV	Edad IDCV (años)	Mujer control	Hombre control	Edad controles (años)
Bcl-2	39%	61%	40(±2,8)	-	-	-
Bcl-xl	51%	49%	43 (±2,7)	35% *	65% *	37 (±2,4)*
Activaciones Naive	57%	43%	41 (±3,5)	40%	60%	41 (±2,7)
Akt y S6	52%	48%	42 (±3,2)	29% *	71% *	36 (±2,4)*
microARNs	48%	52%	46 (±3,6)	56%	44%	34 (±2,9)
Metilacion	36%	64%	41(±3,1)	38%	63%	38 (±2,6)

Bloque experimental I: Señalización intracelular linfocito B

Citometría de superficie para subpoblaciones B

El análisis del fenotipo B de sangre periférica se realiza con 300 μ l de sangre total recogida en tubos de heparina de litio. Se efectúan dos lavados con 4 ml de PBS, centrifugación a 1300 revoluciones por minuto (rpm) durante 7 minutos e incubación en oscuridad durante 20 minutos con los anticuerpos de superficie CD27 FITC (clon L128), CD19 PERCP CY 5.5 (clon SJ25C1), CD38 FITC (clon HIT2) y CD21 PE (clon B-ly4) (BD Biosciences), IgD PE (Southern Biotech) e IgM APC (Jackson Immune Research). Posteriormente se lisan los eritrocitos con solución de lisis *FACS Lysis*, durante 10 minutos en oscuridad, se centrifugan a 1300 rpm durante 5 minutos, se lavan con PBS, las muestras se resuspenden en 250 μ l de *FACS Flow*, y se procede a la adquisición de 10.000 linfocitos CD19⁺ en citómetro de flujo FACS Calibur ó FACS Canto II (BD Biosciences).

Para el análisis de las subpoblaciones B (Figura 7) seleccionamos la población de linfocitos por tamaño y complejidad (FSC/SSC), los linfocitos CD19 (CD19/SSC) y en un diagrama que represente los marcadores CD27 frente a IgD. Así se definen las poblaciones B *Naive* (CD19⁺ CD27⁻ IgD⁺), B de memoria sin cambio de isotipo (USm) (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺) y las B de memoria con cambio de isotipo (Sm) (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻). Para definir las células transicionales se representa en un diagrama CD38 frente a IgM, dicha población se caracteriza por ser positivas para CD38 e IgM de alta intensidad (CD38⁺⁺ IgM⁺⁺). En el mismo diagrama se seleccionan los plasmablastos (CD38⁺⁺⁺ IgM⁻). Y finalmente para la selección de células CD21^{low} en un diagrama con los marcadores CD38 frente a CD21 se define la población CD38 negativo y CD21 de baja intensidad.

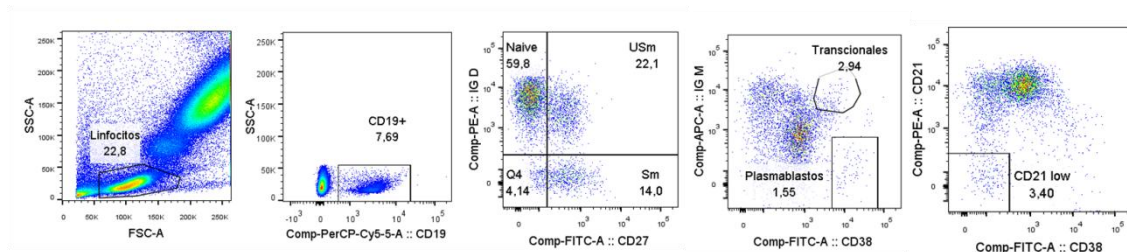


Figura 7: Estrategia de análisis de las subpoblaciones B de sangre periférica.

Aislamiento de células mononucleares en gradiente de densidad por Ficoll

Para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se procede partiendo de sangre total periférica recogida en tubos con heparina de litio, se resuspende en 1/3 de medio Hank's o en tampón fosfato salino (PBS) (según el protocolo). Esta dilución de la sangre se añade despacio, en un tubo de 50 ml, sobre 15 ml de Ficoll (Ficoll-Paque Premium, VWR Internacional, Eurolab). Se centrifuga durante 30 minutos a 1800 rpm, con el freno de la centrífuga al mínimo.

Se recoge el halo de células y se lava en tubos de 50 ml con el correspondiente medio o PBS. Se centrifuga durante 10 minutos a 1500 rpm, con el freno en posición intermedia. Se decanta y se diluye en 2 ml del correspondiente medio o PBS, para coger una pequeña fracción y se cuenta en el contador de células. El resto se vuelve a lavar con medio o PBS a 1500 rpm durante 10 minutos. Mientras tanto se obtiene el resultado del número de leucocitos y se resuspenden en el correspondiente medio o PBS para los posteriores protocolos.

Citometría para proteína intracelular Bcl-2

Para el estudio de la proteína intracelular Bcl-2 por citometría de flujo se utilizan 300 µl de sangre total recogida en tubo de heparina de litio, se lisan con 1 ml de solución de lisis durante 10 minutos en oscuridad, centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos. Se lava con 1 ml de PBS+ 0,5% BSA (1300 rpm, 5 minutos). A continuación se procede al paso de permeabilización de la membrana celular con la solución *Permeabilizing Solution 1* (dilución 1:10 con agua destilada) durante 10 minutos y lavado en las mismas condiciones anteriores con 1 ml de PBS+ 0,5% BSA. Incubamos las muestras permeabilizadas durante 30 minutos con los anticuerpos de superficie e intracelulares en oscuridad: Bcl-2 FITC (clon Bcl-2/100), CD19 PERCP CY 5.5 (clon SJ25C1), isotípico mouse IgG1 FITC, *k* (BD Biosciences) e IgD PE (dilución 1:50 PBS, Southern Biotech), CD27 APC clon M-T271 (Miltenyi Biotec). Se realiza un último lavado con 1 ml de PBS+ 0,5% BSA (1300 rpm, 5 minutos) y finalmente se resuspenden las células en 250 µl de PBS FACS, para adquirir en citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

Para el análisis de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de Bcl-2 (Figura 8), se seleccionan los linfocitos por FSC/SSC, la población CD19 y con los marcadores CD27 e IgD definimos los linfocitos: B *Naive*, B de memoria sin cambio de isotipo (USm) y las B de memoria con cambio de isotipo (Sm). Sobre cada una de estas poblaciones se analiza la IMF de Bcl-2 con un histograma, siempre y cuando en cada subpoblación haya al menos 100 eventos adquiridos. Así mismo se analiza la IMF del control isotípico seleccionando los linfocitos B (CD19⁺) y realizando un histograma. El resultado final de las IMF de cada población se obtiene restando al valor de Bcl-2 para subpoblación el valor del control isotípico.

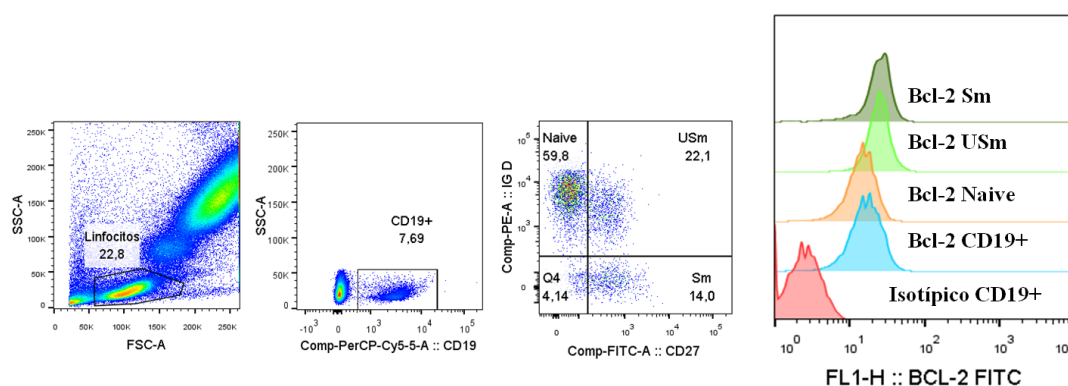


Figura 8: Estrategia de análisis de las IMF de Bcl-2 en las subpoblaciones B.

Citometrías intracelulares para las proteínas Bcl-xl, Akt y S6

Este protocolo de fijación y permeabilización es compartido para la detección intracelular de las siguientes proteínas, solo cambia la combinación de anticuerpos: Bcl-xl, Akt y S6. Protocolo modificado basado en recomendaciones del fabricante y en el original de Chow et al ¹²⁴.

Se alicuotan 100 µl de sangre total por tubo, se lava con 1 ml de PBS+0,5%BSA y se centrifuga a 1300 rpm durante 5 minutos. A continuación se procede a la incubación con anticuerpos de superficie, previamente se han testado los anticuerpos y fluorocromos que resisten la fijación y permeabilización posteriores, en este caso con 2 µl de CD27 VB421 (clon M-T271 BD Biosciences) e incubación de los tubos en oscuridad durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Lavado con 1 ml de PBS+0,5%BSA (1300 rpm, 5 minutos). Paso de fijación con 10% de formaldehído, durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se procede a la permeabilización de las células con 1 ml de 0,1% Triton X-100 durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Se lava dos veces consecutivas con 1 ml de PBS+0,5% BSA, se centrifuga (1300 rpm, 5 minutos). Las células se incuban durante 15 minutos en hielo con 1 ml de 50% metanol en PBS (la dilución del metanol habrá permanecido a -20°C hasta su uso). Lavado con 3 ml de PBS+0,5% BSA y centrifugación (1300 rpm, 5 minutos). Tras este último paso se decanta el sobrenadante dejando solo 100 µl, para incubarlo con el resto de anticuerpos de superficie CD3 APC (clon UCHT1; BD Biosciences) CD19 PE CY 7 (clon J3-119 Beckman Coulter), IgD PE (Southern Biotech) y los anticuerpos intracelulares correspondientes (2 µl) Bcl-x1 Alexa Fluor 488 (clon 54H6), Akt Alexa Fluor 488 (AF488) (clon 5G3), S6 AF 488 (clon 54D2) (todos de Cell Signaling), así como los anticuerpos isotípicos necesarios para cada proteína, en el caso de Bcl-x1 su isotípico es un anticuerpo IgG anti-conejo, mientras que para Akt y S6 su isotípico correspondiente es un IgG1 anti-ratón (clon MOPC-21) (Cell Signaling). Los correspondientes controles isotípicos se usan a la misma concentración de anticuerpo que los específicos (Bcl-x1, Akt y S6). Se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Se realiza el lavado final previo a la adquisición con 3 ml de PBS+0,5% BSA, centrifugación (1300 rpm, 5 minutos) y se resuspenden las células en 250 µl de PBS para adquirir en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences).

El análisis de las intensidades medias de fluorescencia se realizó con el programa de análisis para citometría de flujo Flow Jo (LLC), para cada una de las proteínas intracelulares Bcl-x1, Akt y S6 se realiza de la siguiente forma (Figura 9): selección de linfocitos por FSC/SSC, a continuación de células CD19⁺ y sobre ellas en un diagrama CD27 e IgD para definir las poblaciones: B *Naive*, U_{Sm} y S_{Sm}. Sobre cada una de estas poblaciones así como CD19⁺ totales se realizan histogramas que representen las IMF. Así mismo, se analiza la IMF de cada correspondiente control isotípico sobre CD19⁺ totales. Para normalizar las IMF de cada proteína en cada subpoblación se le resta su correspondiente control isotípico.

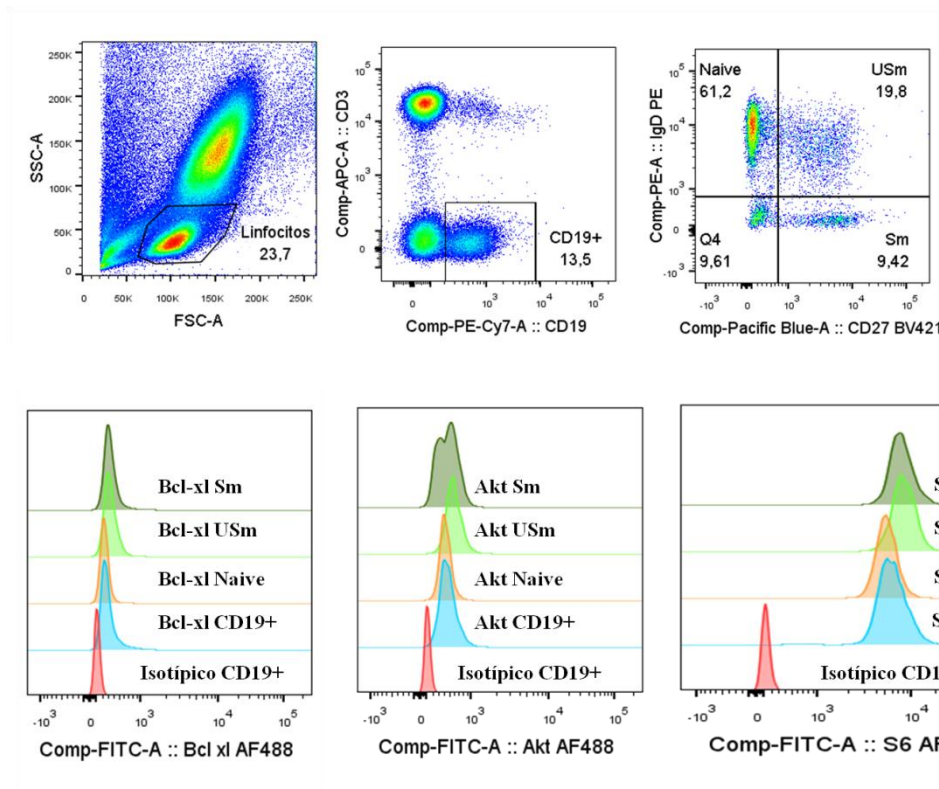


Figura 9: Estrategia de análisis de las proteínas intracelulares Bcl-xl, Akt y S6 en células B CD19⁺, Naive, USm y Sm.

Citometría intracelular y activación con anti IgM para proteínas fosforiladas

Se obtienen PBMCs por gradiente de densidad por Ficoll (Ficoll-Paque Premium, VWR Internacional, Eurolab) y medio Hank's para realizar los sucesivos lavados. Se realiza el conteo del número de leucocitos, se resuspenden a millón por ml en medio RPMI completo: suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF), penicilina, estreptomycin y glutamina.

Para el posterior proceso de activación y detección intracelular de proteínas fosforiladas, se utilizan 500.000 leucocitos resuspendidos en 500 µl de RPMI completo. Algunas de las soluciones requieren preparación previa siguiendo las recomendaciones del fabricante, en el caso de la solución de fijación (5x) se necesita hacer dilución 1x y precalentarla a 37°C. Mientras que la solución de permeabilización debe enfriarse a -20°C. Se siguen los protocolos establecidos por *Phosflow* (BD Biosciences), detallados a continuación.

Para cada experimento, se preparan los siguientes tubos: un tubo sin tinción y sin estímulo, el control isotópico acompañado de CD19, células sin estimular para cada proteína intracelular junto con los marcadores de superficie, que constituirán las pruebas basales de fosforilación. Así como las células estimuladas a 5, 10 y 15 minutos (min) con anti IgM para cada proteína fosforilada:

-Sin tinción sin estímulo

-Isotópicos +CD19 PE CY7

-Sin estímulo (basal) pAKT AF488+ CD19 PE CY7+ CD27 BV421+IgD PE

-Sin estímulo (basal) pS6 AF488+ CD19 PE CY7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg/ml anti IgM; 5min) pAKT AF488+ CD19 PE CY7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg /ml anti IgM; 5 min) pS6 AF488+ CD19 PE CY7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg /ml anti IgM; 10 min) pAKT AF488+ CD19 PE CY7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg /ml anti IgM; 10 min) pS6 AF488+ CD19 PE CY 7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg/ml anti IgM; 15 min) pAKT AF488+ CD19 PE CY 7+ CD27 BV421+IgD PE

- (+15 µg/ml anti IgM; 15 min) pS6 AF488+ CD19 PE CY 7+ CD27 BV421+IgD PE

Las células se mantienen en reposo durante 30 minutos en estufa a 37°C, en este tiempo realizar la tinción con marcadores de superficie CD19 PE CY7 (clon J3-119 Beckman Coulter) y CD27 BV421 (clon M-T271 BD Biosciences), previamente se ha testado esta combinación que permite la detección de los anticuerpos de superficie sin que sufran degradación de los epítomos y/o fluorocromos por el método de permeabilización utilizado posteriormente.

Se tratan las células con el estímulo, 15 µg/ml del fragmento F(ab')₂ específico de la cadena µ de anti IgM humana (Southern Biotech) durante 5, 10 ó 15 minutos a 37°C. Para detener el estímulo con anti IgM, se fijan las células con 3 ml de la solución *Lyse/fix* durante 10 minutos a 37°C. Se centrifugan las células a 600 g durante 6 minutos y se retira el sobrenadante, se resuspenden las células y se lavan con 3 ml PBS. Se vuelve a centrifugar (600 g, 6 minutos), se resuspenden las células y se procede a la permeabilización con 1 ml de la solución *PermIII* (frío) por cada 1-10x10⁶ células (mínimo 1 ml) y se incuba durante 30 minutos en hielo.

Las células se lavan a continuación con 3 ml de PBS+2% STF, se centrifugan (600 g, 6 minutos) y se descarta el sobrenadante procurando que no queden más de 50 µl de volumen residual. Se resuspenden las células y se disuelve el sedimento con la ayuda de un vórtex. Se repite este lavado y se procede a incubar las células con 20 µl de los anticuerpos intracelulares ratón anti Akt Alexa Fluor 488 (clon M9-61) y ratón anti S6 Alexa Fluor 488 (clon N7-548) (BD Phosflow), control isotópico ratón IgG1K (clon MOPC-21, BD Phosflow) y de superficie IgD PE (Southern Biotech) y CD3 APC (clon UCHT1 BD Biosciences) durante 60 minutos en oscuridad. Se lavan las células con 3 ml de PBS+2% STF. Se centrifuga (600g, 6 minutos) y se descarta el sobrenadante, con el vórtex se disuelve el sedimento y finalmente se resuspenden las células en 250 µl de PBS para adquirir las muestra en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences).

Los anticuerpos intracelulares utilizados en el caso de ratón anti Akt Alexa Fluor 488 (clon M9-61) reconoce el residuo de serina (ser) 473, este sitio de fosforilación es compartido por las tres isoformas de Akt. Y para la proteína ribosomal S6 se detecta la fosforilación en los residuos de ser 235 y ser 236.

El análisis de las intensidades medias de fluorescencia se realizó con el programa Flow jo (LLC) para cada una de las proteínas fosforiladas p Akt y p S6 de la siguiente forma: selección de linfocitos por tamaño y complejidad (FSC/SSC), a continuación de células CD19+ y sobre ellas en un diagrama CD27 e IgD se definen las siguientes poblaciones: B *Naive*, U_{Sm} y S_{Sm}. Sobre cada una de estas poblaciones así como CD19⁺ totales se realizan histogramas que representen las IMF (Figura 10). Para normalizar las IMF de cada proteína en cada subpoblación se le resta su correspondiente control isotópico. A continuación se analizan los incrementos de fosforilación para cada subpoblación de células B, el incremento de los distintos tiempos de estímulo (5, 10 y 15 minutos de activación con anti IgM) con respecto al no estimulado (basal).

$$\text{Incremento fosforilación} = \text{IMF fosforilación anti IgM a distintos tiempos} / \text{IMF fosforilación basal.}$$

Esta mismo análisis de IMF para detectar la fosforilación de S6 se ha seguido para la fosforilación de Akt, para ambas proteínas esta secuencia se ha realizado en células sin estimular (basales), y las estimuladas con anti IgM durante 5, 10 o 15 minutos.

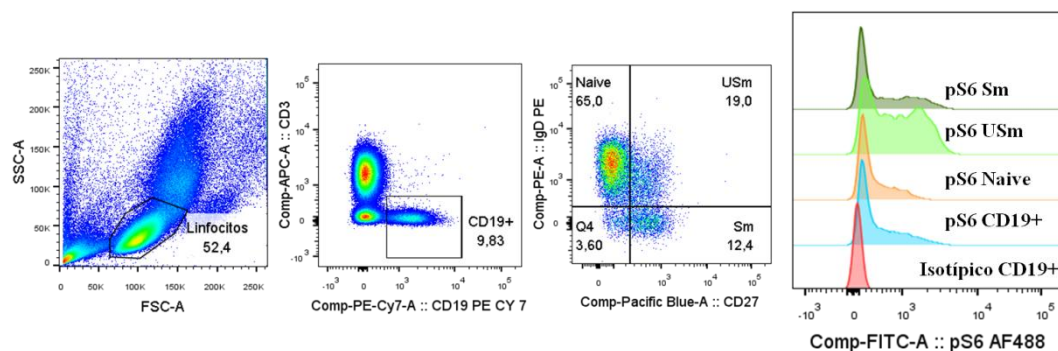


Figura 10: Estrategia de análisis para detectar la fosforilación basal y tras activación con anti IgM durante 5, 10 ó 15 minutos de las proteínas Akt y S6 en las distintas subpoblaciones B.

Consideraciones generales para la adquisición de muestras para citometría de flujo

Para cada uno de los experimentos anteriormente especificados, se compensó el citómetro con los correspondientes voltajes y compensaciones específicas en cada caso.

El análisis de los datos se realizó con el Software FACS DIVA en el caso de los marcadores de superficie y detección intracelular de Bcl-2. Para el resto de proteínas intracelulares y fosforiladas los resultados se analizaron con Flow Jo.

Todos los análisis estadísticos de las citometrías se han realizado con el paquete estadístico Graphpad Prism 5.0, con el test de Mann Whitney y se considera significación para *P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; ***P-valor <0,001.

Separación magnética de células *Naive* y activaciones a 4 días con CD40L+IL-21

La recogida de células *Naive* partiendo de sangre periférica se realiza en un primer paso de aislamiento de PBMCs en gradiente de densidad por Ficoll, en este caso la sangre total se resuspende en PBS, puesto que los medio tipo Hank's que llevan calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{+}) afectan a la posterior unión específica de los anticuerpos con partículas magnéticas.

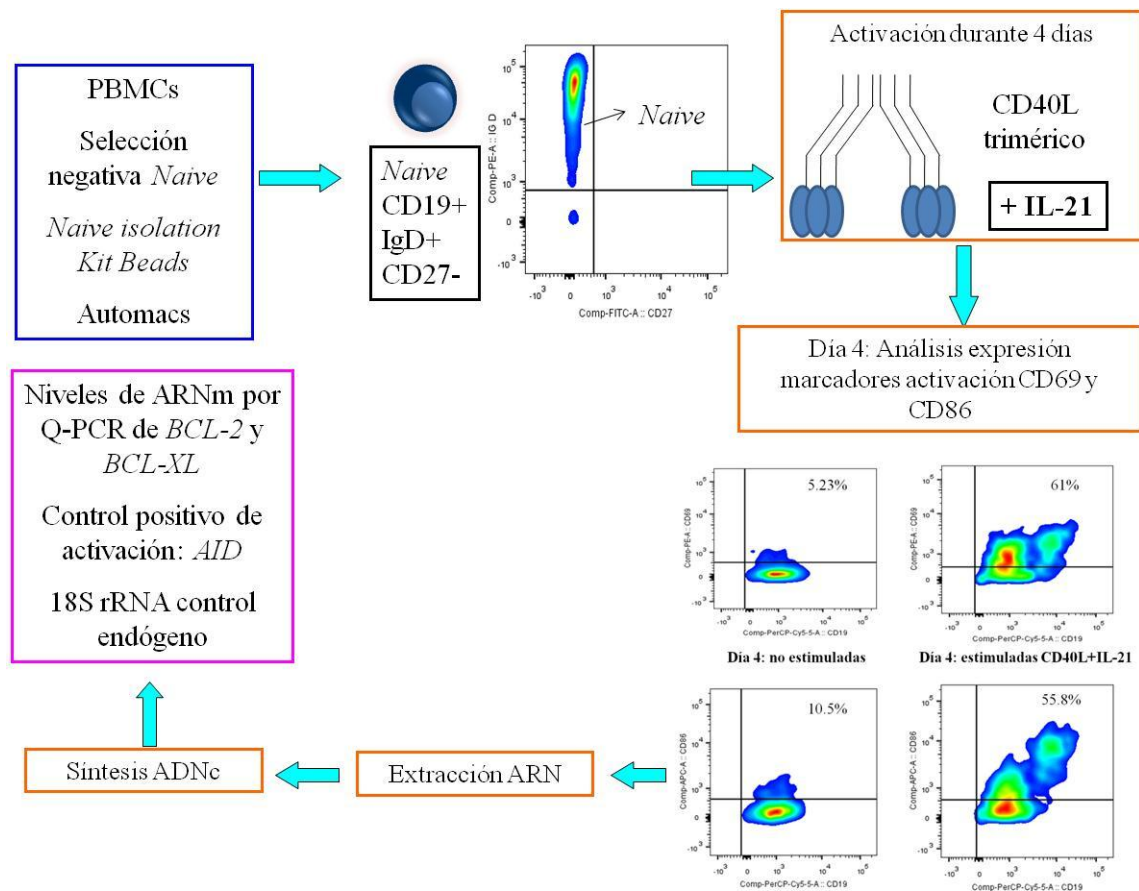


Figura 11: Esquema de la metodología seguida para la activación de células *Naive*, purificadas de PBMCs, activadas durante 4 días con CD40L e IL-21. Tras 4 días de activación *in vitro* se recogen las células, en una pequeña parte se analiza la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD86 mediante citometría de flujo. Se extrae el ARN del resto de células del cultivo, se sintetiza el ADNc y se detectan los niveles de ARNm por Q-PCR de los genes *BCL-2* y *BCL-XL*. Se analiza la expresión del gen *AID* como control positivo de activación y la subunidad ribosomal 18S como control endógeno.

Una vez obtenidos los PBMCs, se resuspenden en *Running Buffer* (RB; Miltenyi Biotec; PBS con BSA y EDTA) se procede a la incubación con el *Naive B cell isolation II Kit* (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante, que consiste en

una primera incubación de 10 minutos a 4°C con *Cell biotin antibody cocktail* que contiene los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con biotina: CD2, CD14, CD16, CD27, CD36, CD43 y CD235a (glicoforina A). Esta mezcla permite la selección de todas las poblaciones presentes tras el aislamiento de PBMCs de sangre periférica excepto las células B *Naive* de interés. A continuación, se realiza el segundo paso que consiste en incubar durante 15 minutos a 4°C con los anticuerpos con partículas magnéticas conjugadas con anti biotina. Se realiza un lavado con RB a 300g durante 10 minutos y se resuspenden en 500 µl de RB.

La separación magnética se realiza en el procesador *Automacs* (Miltenyi Biotec). Este aparato requiere de un primer paso de lavado de las columnas, para proceder seguidamente a seleccionar el programa adecuado, en este caso *Depletes*, que realiza una depleción o selección negativa de las poblaciones marcadas con las partículas magnéticas en modo sensible, que serán la fracción positiva, mientras que la fracción negativa que se eluya serán las células B *Naive* de interés.

Para determinar la pureza de las dos fracciones se procede a la incubación con anticuerpos de superficie de interés con una mínima cantidad de las fracciones (CD19 PERCP CY 5.5, IgD PE, CD27 FITC, CD3 APC) (Figura 12).

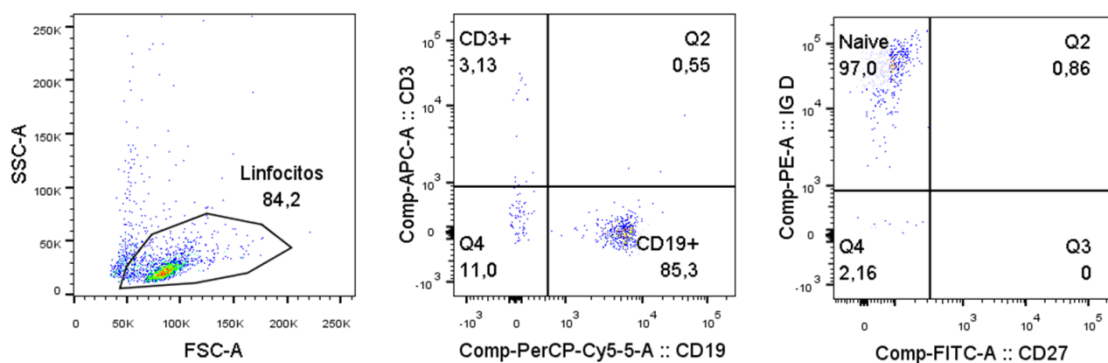


Figura 12: Análisis de la pureza de las células *Naive* obtenidas tras el aislamiento.

Así mismo se realiza un conteo al microscopio con una cámara de *Neubauer* con 10 µl de cada fracción y 10 µl de azul tripán para determinar el número de células y su viabilidad, las células azules se contabilizan como muertas, ya que habrá penetrado el colorante dado que tienen las membranas desestructuradas.

Para ajustar la cantidad de células a las posteriores condiciones del cultivo, se lava la fracción de células B *Naive* con medio *Hank's* y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Para finalmente ajustar las células a razón de 100.000 células por cada 200 μ l de RPMI completo (suplementado con 10% STF, penicilina, estreptomicina y glutamina).

Según el número de células B *Naive* aisladas se distribuyen en la placa de 96 pocillos de fondo plano. Siempre al menos un pocillo de la condición sin estímulo y de la condición estimulada con 2 μ g/ml de MegaCD40L soluble, humano, recombinante (Enzo Life Sciences) y 100 ng/ml de IL-21 recombinante humana (Gibco, Life Technologies). Las células B *Naive* se mantienen durante 4 días a 37°C en estufa y con condiciones de humedad y 5% CO₂.

Al cabo de ese tiempo se recogen las células de los correspondientes pocillos, se extrae una pequeña cantidad (20 μ l) de células para el análisis por citometría de flujo de los marcadores de activación CD69 y CD86. El resto de células se lavan con PBS y se centrifugan a 1800 rpm durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y se congela inmediatamente el sedimento a -80°C.

El análisis de los marcadores de activación, se realiza con una pequeña fracción de células que se incuba durante 20 minutos en oscuridad con los siguientes marcadores CD19 PERCP CY 5.5, CD27 FITC, CD69 PE (clon L78), CD86 APC (clon 2331 Fun-1) (BD Biosciences) y los correspondientes anticuerpos isotípicos. Se realiza un lavado con PBS (1300 rpm, 5 minutos), se resuspenden las células en 250 μ l de PBS FACS, y se adquieren en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Se detecta la expresión de marcadores de activación CD69 y CD86, que nos dan una idea de que las condiciones de estimulación *in vitro* han sido adecuadas. El análisis se realiza seleccionando la población de linfocitos en cuanto a tamaño y complejidad (FSC/SSC), la población CD19+ y sobre esta población se analiza el incremento de las intensidades medias de fluorescencia de CD69 y CD86 de las muestras activadas con CD40L+IL-21 con respecto a las no estimuladas (Figura 13).

Incremento= IMF *Naive* activadas/ IMF *Naive* no activadas.

Las gráficas de resultados muestran la media del incremento de cada grupo con sus correspondientes barras de error estándar de la media (EEM).

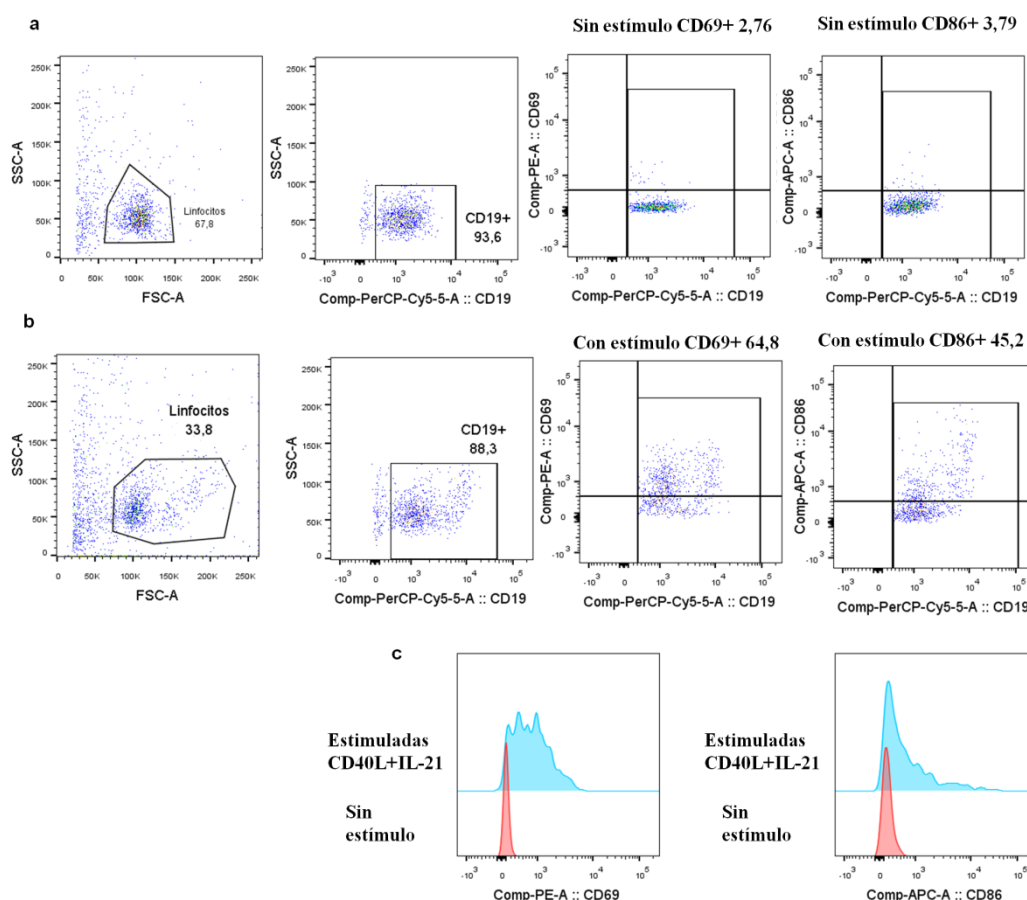


Figura 13: Análisis de los marcadores de activación CD69 y CD86, **a** en células no estimuladas mantenidas en cultivo durante 4 días y **b** células estimuladas durante 4 días con CD40L e IL-21. **c** IMF de CD69 y CD86 en células no estimuladas en rojo y en azul células estimuladas con CD40L e IL-21.

Extracción de ARN total y microARNs

Para la extracción de ARN total que incluye ARN de pequeño tamaño (microARNs) se utilizó el *Kit miRNeasy micro Kit* (Qiagen). Este kit está optimizado para extraer ARN total partiendo de menos de 1 millón de células. A continuación se detalla el protocolo recomendado por el fabricante.

A partir de los sedimentos congelados a -80°C , los primeros pasos se realizan en campana extractora de gases, primero se procede a la resuspensión del sedimento en 700 μl de *Qiazol*, y se homogeniza durante 1 minuto, a continuación se deja reposar la suspensión a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos, para disociar los

complejos de nucleoproteínas. Se añaden 140 µl de cloroformo y se agita vigorosamente el tubo durante 15 segundos. Se deja en reposo durante 2-3 minutos y se centrifuga a 10.700 rpm a 4°C. El resto de centrifugaciones posteriores se han de realizar a temperatura ambiente (15-25°C).

Después de la centrifugación se obtienen 3 fases: la superior incolora, la fase acuosa blanca que tiene el ARN y la fase orgánica de color rosa. El volumen de la fase acuosa debe ser de unos 350 µl. La fase acuosa que contiene el ARN se transfiere a un tubo nuevo que contenga 525 µl de etanol 100% y se mezcla pipeteando varias veces. Seguidamente se transvasan hasta 700 µl de la muestra (si hay más volumen realizar este paso en dos veces) a una *RNeasy Minelute spin column* contenida en un tubo de recogida de 2 ml. Se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 segundos y se descarta el sobrenadante. Se repite el paso anterior si había más de 700 µl de volumen.

Se añaden 700 µl del buffer RWT a la columna *RNeasy minelute spin* y se centrifuga (10.000 rpm, 30 segundos), a continuación se añaden 500 µl del buffer RPE a la columna y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones para lavar la columna. Se pipetea 500 µl de etanol al 80% (con agua libre de RNAasas) a la columna y se centrifuga durante 2 minutos a 10.000 rpm para lavar la membrana de la columna.

Se retira la columna del tubo de recogida teniendo cuidado que no entre en contacto con el sobrenadante. Se coloca la columna en un nuevo tubo de recogida y con la tapa abierta se centrifuga a velocidad máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos para secar la membrana y evitar que el etanol interfiera en posibles aplicaciones posteriores. En este paso se descarta el sobrenadante y el tubo de recogida.

Finalmente se deposita la columna en nuevo tubo para eluir el ARN con agua libre de RNAasas, para ello se añade directamente el agua al centro de la columna, se deja reposar durante 1 minuto y se centrifuga a velocidad máxima otro minuto, este último paso se puede repetir para eluir todo el ARN que esté en la membrana de la columna. Se congela inmediatamente el ARN a -80°C.

Análisis de ARN mensajero por Q PCR de células *Naive* activadas

Tal y como se ha descrito anteriormente se estimularon las células B *Naive* durante 4 días con CD40L+IL-21. El ARN se extrajo siguiendo el procedimiento previamente descrito.

Las PCR cuantitativas a tiempo real (Q-PCR) se pueden hacer en dos o en un solo paso. En este caso usamos dos pasos: primero se realiza la retrotranscripción del ARN total a ADN complementario (ADNc) y en un segundo paso se procesa la reacción de amplificación. El producto amplificado por esta técnica en cada ciclo, permite obtener un valor cuantitativo sobre el número de moléculas iniciales de partida en cada muestra. Para su correcto desarrollo se utilizan secuencias específicas del ADNc, que puede ser amplificado varios miles o millones de veces con cebadores específicos, ADN polimerasa y un termociclador. La amplificación del ADN es exponencial, doblando el número de moléculas en cada ciclo de amplificación. En la Q-PCR, la cantidad de ADN se mide después de cada ciclo gracias a las moléculas fluorescentes acopladas a cada sonda, se incrementa la señal fluorescente de manera proporcional al número de moléculas del producto de PCR generadas. Los datos se recogen en la fase exponencial de la reacción.

Para el análisis de ARN mensajero (ARNm) se procedió a la síntesis de ADNc. En este caso 50 ng de ARN total se retrotranscribieron para sintetizar el ADNc. Esta reacción de síntesis se realiza usando un kit adecuado para pequeñas cantidades (hasta 2 µg de ARN) *High capacity RNA-to-c DNA kit* (Applied Biosystems), se obtiene un volumen total de 10 µl de ADNc, la reacción de síntesis se realiza en un termociclador durante 60 minutos a 37°C, seguido de 5 minutos a 95°C para finalmente enfriar a 4°C. Los 10 µl de ADNc de cada muestra se reparten en tres mezclas de reacción de PCR diferentes para la amplificación de *BCL-XL*, *AID* y *BCL-2* con 18S. Esta última reacción se realiza simultáneamente usando dos sondas BCL-2-FAM y el control endógeno 18S-VIC. El control endógeno se usa para normalizar los niveles de expresión entre experimentos, ya que atenúa las posibles diferencias de la cantidad total de ADNc que se añade a cada reacción.

La reacción se realiza en placas de 96 pocillos en la máquina *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System*, en un volumen de 20 µl por reacción con una mezcla comercial que ya incluye la enzima ADN polimerasa, dNTPs y Mg⁺, la

correspondiente cantidad de ADNc (3,3 µl por triplicado) y las sondas comerciales *Taqman*. Dichas sondas contienen una secuencia específica para cada gen y se unen a su diana entre los dos cebadores. En el extremo 5' está el reportero que es fluorescente y da la señal de la amplificación de la diana. Mientras que en el extremo 3' está el inhibidor de la fluorescencia (extintor), que apaga la fluorescencia del reportero en sondas intactas. Este inhibidor también bloquea el extremo 3' de la sonda para que no pueda seguir extendiéndose por la acción de la ADN polimerasa.

Las sondas *TaqMan MGB*, son moléculas de unión al surco menor del extremo 3', que se forma en el ADN, son más cortas que los cebadores convencionales para PCR y aumentan en 10°C la temperatura de anillamiento, lo que las hace más específicas. Las sondas usadas en este ensayo contienen el reportero fluorescente (FAM) excepto para el control endógeno que contiene el reportero fluorescente (VIC).

Para este ensayo se han usado 4 sondas diferentes: BCL-XL-FAM, AID-FAM, BCL-2-FAM y 18S-VIC. Se han hecho reacciones simultáneas para BCL-2-FAM y el control endógeno 18S-VIC. De esta manera se pudo incrementar el rendimiento de las muestras, añadiendo más muestras en una misma placa de PCR, así como para optimizar la cantidad de muestra utilizada para cada reacción.

Los pasos de la PCR a tiempo real durante 50 ciclos de amplificación son los siguientes:

2 minutos a 50°C, paso previo para la activación óptima de la enzima, 10 minutos a 95°C para activar la enzima, 15 segundos a 95°C para desnaturalizar el ADN y 1 minuto a 60°C para la fusión de los cebadores y la extensión de los cebadores.

-Desnaturalización a 95°C, con esta temperatura se consigue la desnaturalización de la hebra de doble cadena y que pierda la estructura secundaria y la activación de la enzima ADN polimerasa.

-Anillamiento: la temperatura de fusión de los cebadores para hibridar.

-Paso de extensión: a 60°C es la temperatura para la actividad óptima de la ADN polimerasa y tiene lugar la extensión de los cebadores.

Para el análisis de los datos se han usado los programas *SDS software* y *RQ manager* (Applied Biosystems). En el programa *SDS* se establece el umbral automático

y se pueden detectar los triplicados erróneos. Para analizar cada paciente y control se realiza por separado puesto que el correspondiente calibrador será la misma muestra sin estimular y a su vez cada muestra estimulada o no referida al gen endógeno 18S.

En el caso del gen *AID* que no se expresa en células *Naive* sin activar y por tanto no puede determinarse por Q-PCR, se asigna un ciclo de amplificación 42 por defecto, ciclo en el que no se detecta ninguna otra señal.

La cuantificación de la expresión relativa de *BCL-2*, *BCL-XL* y *AID* analizadas mediante Q-PCR, se calcula de acuerdo al método comparativo de ciclo umbral ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). La expresión se normaliza usando como control endógeno la subunidad ribosomal 18S y refiriendo el valor de expresión relativa en las células *Naive* activadas durante 4 días con CD40L e IL-21 a las correspondientes muestras de células *Naive* no activadas. La representación de los resultados se expresa como la expresión relativa de cada gen tras activación, con respecto a la misma muestra sin estimular.

$$\text{Diferencia del incremento} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra estimulada} - \Delta Ct \text{ muestra sin estímulo}$$

$$\Delta Ct \text{ muestra estimulada} = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta Ct \text{ muestra sin estímulo} = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

Los resultados se representan en las gráficas como la media de la expresión relativa de cada ARNm en el grupo control o de pacientes con las correspondientes barras de EEM.

La comparación del incremento de los distintos ARNm analizados entre pacientes y controles se ha realizado con el paquete estadístico Graphpad Prism 5.0, mediante el test de Mann Whitney y considerando significación para *P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; ***P-valor <0,001.

Bloque experimental II: Materiales y métodos microARNs

Separación magnética de células CD19⁺

Los PBMCs se obtienen a partir de sangre heparinizada por gradiente de densidad por Ficoll (Ficoll-Paque Premium, VWR Internacional, Eurolab). A continuación se realiza una separación magnética positiva de linfocitos B (*CD19 Microbeads Human, Macs and CliniMacs Products Miltenyi*). Para ello siguiendo las instrucciones del producto, los PBMCs se resuspenden en *Running Buffer* (RB; Miltenyi Biotec; PBS con BSA y EDTA) a razón de 80 µl por cada 10 millones de células, se incuban con las partículas magnéticas anti CD19 (20 µl de anticuerpo por cada 10 millones de células) durante 15 minutos en frío y en oscuridad. Se realiza un lavado con RB y se procede a la separación magnética en el aparato *Automacs* con el programa de selección positiva *PosselD* (Miltenyi Biotec). La fracción eluida positiva contiene la población de interés (CD19⁺). Se comprueba la pureza por citometría de flujo: CD20 FITC (clon L27), CD19 PERCP CY 5.5, CD3 APC (BD Biosciences) (Figura 14). Se incluye el marcador CD20, porque la separación se realiza con partículas magnéticas anti CD19 por lo que dicho receptor puede estar ocupado, para no infravalorar la pureza de linfocitos B se analiza el porcentaje de CD20⁺. Para determinar el número de células obtenidas en la fracción positiva se cuentan al microscopio con la cámara de *Neubauer* con 10 µl de cada fracción de células obtenidas y 10 µl de azul tripán, el colorante que penetrará en las células con las membranas desestructuradas y por lo tanto muertas. Se procede a un último lavado con PBS (1800 rpm, 10 minutos) para congelar directamente el sedimento de células a -80°C. El proceso se continúa siempre que se obtengan purezas mayores del 90-95% CD19⁺/CD20⁺.

Posteriormente se realiza la extracción de ARN, incluidos ARN de pequeño tamaño: *miRNeasy MicroKit* (Qiagen) (descrito anteriormente bloque experimental I).

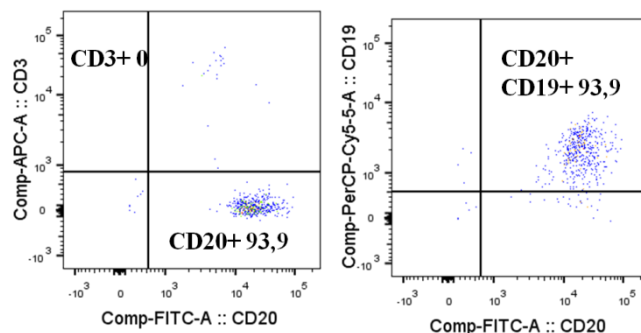


Figura 14: Análisis de la pureza de los linfocitos B obtenidos tras la separación magnética. Se analiza la expresión de posibles linfocitos T (CD3+) que queden tras la separación magnética. Para la detección de linfocitos B se analizan los marcadores CD19 y CD20 específicos de linfocitos B.

Microarray de microARNs

El microarray de microARNs (*Human microARN Microarray, Release 19.0, 8x60K, Agilent Technologies*) se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del CNIC. Se hibridaron 2 µl de ARN (50 ng/µl) de 13 pacientes y 3 controles, la pureza y cantidad de ARN se medieron en un bioanalizador.

El microarray de microARNs utilizado está diseñado con 2027 microARN (más los controles internos). El análisis bioinformático de normalización y filtrado de los datos se realizó en la Unidad de Genómica del CNIC, siguiendo el método de normalización de Bolstad basado en la normalización de cuantiles, solo se consideran para el análisis las sondas que mostraban en al menos 4 muestras una expresión en el percentil 20, para su posterior análisis. Con este requisito obtuvimos finalmente los datos de expresión de 397 microARNs. El primer análisis estadístico se realizó en la Unidad de Genómica del CNIC con el paquete de análisis *limma Bioconductor* para el análisis del grupo control *versus* el grupo de pacientes con IDCv.

Para cada uno de los microARNs obtuvimos los datos de expresión de cada paciente y la media del grupo de pacientes, así como el incremento de la expresión de cada microARN del grupo de pacientes correspondiente referido a la expresión de cada microARN en el grupo control. Para la preselección de microARNs con diferente expresión entre pacientes y controles consideramos un p-valor < 0,09. Se eligieron para validar por Q-PCR, los microARNs que mostraban un mayor incremento en la diferencia de expresión entre controles y pacientes y con mayor nivel de significación.

Además de los criterios anteriormente mencionados, se tuvo en cuenta a la hora de validar por Q-PCR microARNs que algunos tuvieran alguna función descrita al linaje B o a hematopoyesis, pero no fue determinante puesto que son lo suficientemente inexplorados como para no restringirnos solo a los que tienen funciones B descritas.

Se seleccionan los siguientes microARN para validar por Q-PCR, basándonos en los datos de expresión diferencial de cada microARNs con respecto al grupo control: hsa-miR-340-5p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-34a-5p.

Validación de microARNs por Q-PCR

Para validar estos microARN se vuelven a aislar células CD19⁺ de pacientes y controles, por separación magnética a partir de PBMCs y se extrae el ARN total incluyendo los microARNs como se ha descrito anteriormente. Se realiza la síntesis del ADNc a partir de 5 µl de ARN con *Universal cDNA Synthesis Kit II* (Exiqon), para ello se incuba en termociclador durante 60 minutos a 42°C, seguido de 5 minutos a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y finalmente se enfría a 4 °C. Esta reacción de síntesis proporciona el molde de todos los microARNs. Los moldes de microARNs maduros tienen colas poli A, el ADNc se sintetiza usando cebadores poli T con un 3' degenerado y un 5' universal. La amplificación del molde de ADNc se realiza usando cebadores específicos (LNA) sentido y antisentido comerciales (Exiqon) que llevan acoplados el fluoróforo *Sybr green* para detectar la señal.

Para realizar posteriormente una Q-PCR, se realiza una dilución 1/40 del ADNc para finalmente obtener una dilución 1/80 con ROX (tinte de referencia pasiva, que se usa para optimizar las réplicas de cada muestra, se normalizan las señales de cada pocillo individual y así permite la comparación de las amplificaciones de la PCR a tiempo real de todas las muestras de la placa). Para cada muestra se realizan triplicados para cada microARN y para el correspondiente control endógeno en este caso U6. La Q-PCR a tiempo real se realiza en placas de 384 pocillos, con un volumen total de 10 µl: 4 µl de la dilución 1/80 del ADNc y 6 µl de la mezcla de *PCR Master mix Sybr Green* y el cebador del microARN (que viene liofilizado y se resuspende en 220 µl de agua libre de RNasa).

Las condiciones de la Q-PCR a tiempo real son las siguientes: 10 minutos a 95°C para la activación y desnaturalización de la polimerasa, amplificación durante 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

El análisis de los datos de PCR a tiempo real se calcula usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ media de los controles})$ y $\Delta C_t = (C_t \text{ microARN} - C_t \text{ U6})$. Las cantidades de ADNc son normalizadas con el gen de referencia U6. Para cada una de las muestras se realizó un triplicado, para el análisis de los datos solo se han considerado las muestras que tuvieran al menos un duplicado correcto.

Análisis de la expresión de los ARNm diana del microARN validado

Para el análisis de la expresión de los ARNm dianas de los microARNs, se utilizaron las mismas muestras de ARN de células CD19⁺ (descritas anteriormente para la validación de microARNs por Q-PCR). La síntesis del ADNc con 50 ng de ARN total se realizó como se ha descrito anteriormente; así como la Q-PCR a tiempo real de los ARNm diana del microARN.

Análisis de la expresión del microARN y de sus dianas en células *Naive* activadas

Con las mismas muestras obtenidas a partir de PBMCs como se ha descrito en el bloque I, se procedió a la separación magnética de células B *Naive* y a su posterior activación *in vitro* durante 4 días con CD40L+IL-21. Con ARN total extraído de estas muestras (que incluye ARN de pequeño tamaño) se analizó la expresión del microARN, sintetizando el ADNc y llevando a cabo su posterior amplificación con cebadores específicos como se ha descrito en el punto anterior.

El análisis de los datos de Q-PCR se calcula usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, las cantidades de ADNc son normalizadas con el gen de referencia U6.

$$\Delta C_t \text{ estimulado} = C_t (\text{microARN estimulado}) - C_t (\text{U6 estimulado})$$

$$\Delta C_t \text{ no estimulado} = C_t (\text{microARN no estimulado}) - C_t (\text{U6 no estimulado})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{estimulado}) - \Delta C_t (\text{Media controles no estimulados})$$

Niveles de expresión del microRNA normalizados= $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Así se obtienen, los datos en pacientes y controles, de la expresión de miR-34a por separado en muestras no activadas y en muestras activadas.

Análisis estadístico y correlaciones diana microRNA (ARNm y proteína)

El análisis estadístico de expresión de microARN y de sus dianas se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 5.0, con el test de Mann Whitney y se considera significación para *P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; *** P-valor <0,001.

Las correlaciones entre los niveles de expresión del microARN y su diana tanto a nivel de ARNm (por Q-PCR) como a nivel de la proteína Bcl-2 (por citometría de flujo) se realizó usando el coeficiente de Spearman, se considera correlación significativa para P-valor <0,05.

Donde el coeficiente de correlación R, si es igual a 0 las variables no varían a la vez; Para R=1 hay una correlación perfecta, R entre 0 y 1: las dos variables aumentan o disminuyen a la par y R entre 0 y -1: una variable aumenta y la otra disminuye.

Bloque experimental III: Materiales y métodos metilación del ADN

Preparación de las muestras metilación

Los PBMCs se obtuvieron después de la separación por gradiente de densidad por Ficoll (Ficoll-Paque Premium, VWR Internacional, Eurolab). Para la separación de las subpoblaciones B *Naive* (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻), memoria sin cambio de isotipo (USm) (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁺) y memoria con cambio de isotipo (Sm) (CD19⁺ IgD⁻ CD27⁺), se realizó la tinción con los siguientes anticuerpos de superficie CD19 FITC (clon 4G7), CD27 BV421 (clon M-T271) y CD3 APC (clon UCHT1) (BD Biosciences) e Ig D PE (dilución 1:50, Southern Biotech) durante 20 minutos y en oscuridad, a continuación las muestras se lavan con PBS (1300 rpm, 5 minutos) para proceder a realizar la separación celular en un *FACS Aria* (BD Biosciences). La separación celular se realiza en la Unidad de Citometría del CNIO, para ello se realiza una compensación del separador de células por citometría de flujo (*sorter*). Previo a la separación se añade el marcador de viabilidad DAPI, que permite hacer una preselección de las células vivas. Para la compensación del aparato se realiza una tinción de células de un control sano con cada uno de los anticuerpos de superficie por separado, además para la óptima separación de las poblaciones celulares de interés se preparan las muestras controles que están marcados con todos los anticuerpos excepto con uno, de manera que se establecen los ejes óptimos de separación de cada marcador según su negatividad y positividad correspondiente. Para discriminar las distintas subpoblaciones se seleccionan primero las células vivas, los linfocitos, las células CD19⁺ y se seleccionan las células B *Naive*, USm y Sm en base a la expresión de los marcadores CD27 e IgD (Figura 15).

Las muestras obtenidas se recogen en tubos con medio RPMI completo (suplementado con 10% STF, penicilina, estreptomycin y glutamina). Se comprueba la pureza de las muestras con una mínima cantidad de muestra. Las muestras purificadas se lavan con PBS y se centrifugan (1800 rpm, 10 minutos) e inmediatamente se guardan los sedimentos a -80°C.

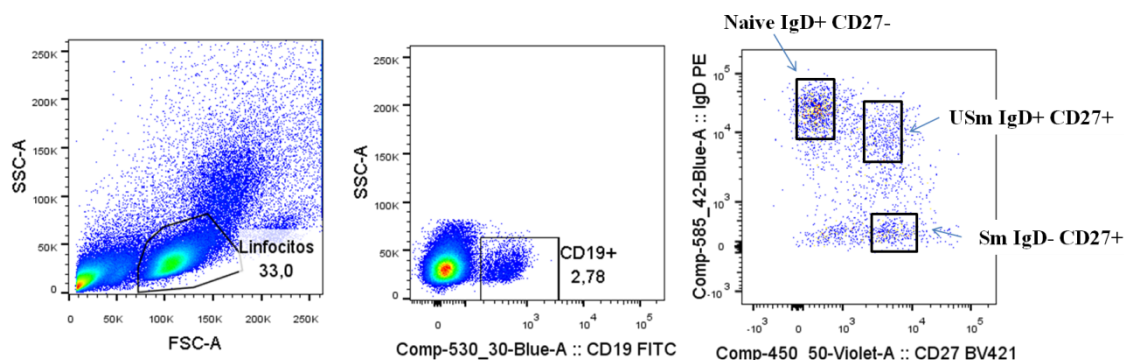


Figura 15: Estrategia de separación de las subpoblaciones B por *Sorting*. Se seleccionan las células vivas con el marcador de viabilidad DAPI, a continuación los linfocitos y las células CD19+ para seleccionar las subpoblaciones B con los marcadores CD27 e IgD. Los cuadrados marcados en el último gráfico representan las ventanas sobre las que se ha procedido al aislamiento de las diferentes subpoblaciones, para evitar la contaminación entre subpoblaciones las ventanas son restringidas hacia el centro de la población.

Extracción de ADN y ARN

A partir de los sedimentos de células purificadas congeladas se procede a la extracción combinada de ADN y ARN con el *kit AllPrep DNA/RNA micro* (Qiagen) optimizado para muestras que tienen menos de 1 millón de células, según indicaciones del fabricante. Al sedimento de células se añaden 350 µl del tampón comercial RLT Plus a continuación se homogeniza el lisado, para muestras que tengan más de 100.000 células requiere la transferencia a través de una columna *QIAshredder* (centrifugación 14.000 rpm, 2 minutos). Para lisados que contengan menos de 100.000 células directamente se pueden homogenizar con la ayuda de un vórtex durante 1 minuto.

Una vez homogenizado, el lisado se transfiere a una columna (*All DNA spin*) y se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 segundos. De esta forma el contenido de ADN queda retenido en la columna, que se mantiene a 4°C para su posterior extracción, mientras que el ARN quedará en el sobrenadante. Ese sobrenadante se mezcla con 525 µl de etanol (100%) y se transfiere a una nueva columna para la extracción del ARN (*RNeasy Minelute*) y se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 segundos. A continuación se añade a dicha columna 500 µl del tampón RPE (10.000 rpm, 30 segundos) se repite este paso con una nueva centrifugación de 2 minutos. Para eliminar todos los restos de etanol que llevan los tampones se vuelve a centrifugar la columna con la tapa abierta a velocidad máxima durante 5 minutos (14.000 rpm). Finalmente se coloca la columna en un tubo nuevo para proceder a la elución del ARN total incluyendo ARN de pequeño

tamaño (microARNs), para ello se añaden 14 µl de agua libre de enzimas que degradan el ARN.

Para optimizar el rendimiento, al añadir el agua se puede dejar reposar durante 2 minutos antes de centrifugar y después de dicha centrifugación se vuelve a pasar el eluido por la columna, volviendo a centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.

El eluido final es ya el ARN que se congela directamente a -80°C hasta su utilización.

Se vuelve al material de la muestra que quedó retenido en la columna original, para proceder a la extracción del ADN. Primero se añaden 500 µl del tampón comercial AW1 (10.000 rpm, 30 segundos), después se añaden de 500 µl del tampón AW2 (14.000 rpm, 2 minutos). A continuación, se coloca la columna en un tubo nuevo para proceder a la elución del ADN, para ello se añaden 50 µl del tampón comercial EB (previamente precalentado a 70°C) se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifuga (10.000 rpm, 1 minuto). Para optimizar la cantidad de ADN recuperado se puede volver a repetir este último paso, volviendo a pasar por la columna el eluido. El ADN se reserva a 4°C si se usa en los próximos días o se congela a -20°C hasta su posterior utilización.

Modificación con bisulfito

Los estudios de pirosecuenciación se realizan a partir de muestras de ADN modificadas con bisulfito. De tal manera que las citosinas (C) se convierten en uracilos (U) pero aquellas citosinas que estén metiladas permanecerán estables como C. La modificación con bisulfito se realizó en placas de 96 pocillos.

Siguiendo el manual del kit *EZ-96 DNA Methylation* (Zymo Research) con 20 µl de ADN se procede a la modificación con bisulfito, con 5 µl del tampón comercial *M-dilution*, se incuba a 37°C durante 15 minutos, a continuación se añaden 100 µl del reactivo de conversión y se incuban las muestras durante 12 horas a 50°C con un paso final de 10 minutos a 4°C. Las muestras se transfieren a una columna (Zymo spin) y se añaden 400 µl del tampón *M-binding*, se centrifugan a 3000g durante 5 minutos, se lavan con el tampón *M-wash* (3000 g, 5 minutos), se añaden 200 µl del tampón *M-desulphonation* y se dejan las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se

vuelven a centrifugar las muestras (3000 g, 5 minutos) y se realizan dos lavados seguidos con 500 μ l del tampón *M-wash* (centrifugar 3000 g, 10 minutos). Se coloca directamente la placa en la llamada placa de elución para proceder a la elución del ADN modificado con bisulfito, para ello se añaden 20 μ l del tampón de elución y se centrifuga a 3000 g durante 3 minutos. El ADN modificado con bisulfito se conserva a -20°C.

Selección de genes

Para el estudio del estado de metilación en las subpoblaciones B de pacientes y controles, se eligieron genes relacionados con la biología de la célula B, tales como receptores de supervivencia, genes implicados en procesos de recombinación somática, en la reacción del centro germinal (CG), regulación de la supervivencia mediado por NF κ B, señalización mediada por JAK/STAT y genes implicados en la diferenciación a células plasmáticas.

En un trabajo previo publicado en *Nature Genetics* en 2015 “*Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation*” por Kulis *et al*¹¹⁶, realizaron un análisis del metiloma de diferentes subpoblaciones B. Gracias a nuestra colaboración con ellos pudimos acceder a los datos de metilación en subpoblaciones *Naive* (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻) y de memoria (CD19⁺ CD27⁺ IgA⁺ o IgG⁺). Con las medias de metilación de los duplicados de cada población, realizamos la diferencia de metilación entre los linfocitos B de memoria y los linfocitos B *Naive*; consideramos las CpG que tuvieran más del 25% de diferencia de metilación. Así mismo calculamos el ratio de metilación de los linfocitos B de memoria *vs.* linfocitos B *Naive*. Para escoger las CpG más relevantes de cada gen, primero seleccionamos todas aquellas que tuvieran más del 25% de diferencia de metilación, después las que tuvieran un ratio <0,5 que significa que hay desmetilación desde el estadio *Naive* a memoria, mientras que ratio >2 significa que hay hipermetilación desde *Naive* a linfocitos B de memoria. Cuando había varias CpG que cumplían estos dos criterios de diferencia metilación mayor del 25% e hipometilación en la transición hacia Sm con ratio menor de 0.5 se selecciona la CpG que esté acompañada de al menos otras dos CpG con similares características.

Para la localización exacta de cada CpG usamos la base de datos *UCSC Genome Browser* (GRCh 37/hg 19).

Se diseñaron cebadores específicos para 10 CpG localizadas en 9 genes (Tabla 3): *AKT* (una CpG hipermetilada en células B naïve con respecto a células B de memoria, y otra CpG de Akt hipometilada en las *Naive* en comparación a las memoria), *BAFF-R* (*TNFRSF13C*), *AID*, *BCL-6*, *BCL-10*, *FOXO1*, *MALT1*, *NFKB2* y *STAT3*. Cada CpG se estudió en las subpoblaciones B separadas Naïve, memoria sin cambio de isotipo (USm) y memoria con cambio de isotipo (Sm) de pacientes IDCV y controles sanos.

Ensayo de activación y cambio de isotipo *in vitro* a partir de linfocitos B *Naive*

La obtención de células *Naive* se realiza de sangre periférica en un primer paso de aislamiento de PBMCs en gradiente de densidad con Ficoll seguido de la purificación de células *Naive* en un *Automacs* como se ha descrito anteriormente.

Las células *Naive* se mantienen en cultivo durante 9 días y se activan con CD40L trimérico soluble e IL-21 como se describe en el apartado del Bloque I. Para este tipo de activación durante 9 días se probaron distintas condiciones de cultivo buscando reproducir en lo posible la reacción del CG. Por un lado el medio de cultivo es RPMI con Hepes, que se suplementa 10% STF, 1% de aminoácidos no esenciales, 2,5 µg/ml de insulina y transferrina, 1% de los antibióticos penicilina y estreptomicina y 0,1% de β-mercaptoetanol. Las placas de cultivo son de 96 pocillos con fondo cúbico.

El cultivo de las células *Naive* se realiza inicialmente con 50.000 células en un volumen de 200 µl para las condiciones de estimulación y de 100.000 células para las condiciones de no estimulación. A día +3 de cultivo se realiza una división de cada pocillo estimulado en uno nuevo. Así por cada pocillo con estímulo ahora habrá dos pocillos cada uno con un volumen con 100 µl de células y medio. Por lo que se completa cada pocillo con otros 100 µl de medio nuevo y estímulos. A día +6 de cultivo se recoge una parte de los cultivos de células tanto de las condiciones con y sin estímulo

para aislar mediante separación por citometría de flujo (*sorting*) las células que hayan hecho el cambio de isotipo.

A día +6 y +9 de cultivo se realiza la separación de células, para ello se marcan las células con los siguientes anticuerpos: CD19 PE CY7, IgD PERCP CY 5.5, IgM BV510, IgA FITC, CD27 BV421, CD38 APC-Alexa 750 y CD3 APC. La incubación de las células con los anticuerpos se realiza en oscuridad durante 20 minutos y a continuación las muestras se lavan con PBS (1300 rpm, 5 minutos) para proceder a realizar la separación celular en un *FACS Aria* (BD Biosciences).

Las células mantenidas en cultivo sin activar siguen presentando un fenotipo propio de células *Naive* con expresión de IgM⁺ IgD⁺ (Figura 16 a), mientras que las células *Naive* activadas a 6 y 9 días, las células que han empezado a hacer el cambio de isotipo son IgM⁻ IgD⁻ y empiezan a aparecer las IgA⁺ (Figura 16 b). Para el aislamiento de las poblaciones de interés en el momento previo a la separación se añade el marcador de viabilidad Topro3, la separación se realiza sobre las células vivas CD19⁺. Las células IgM⁺ IgD⁺ así como las células IgA⁺ que se hayan aislado se recogen en tubos con RPMI completo. Se comprueba la pureza de las muestras con una mínima cantidad de muestra. Las muestras purificadas se lavan con PBS, se centrifugan (1800 rpm, 10 minutos) e inmediatamente se guardan los sedimentos a -80°C, para la posterior extracción de ADN.

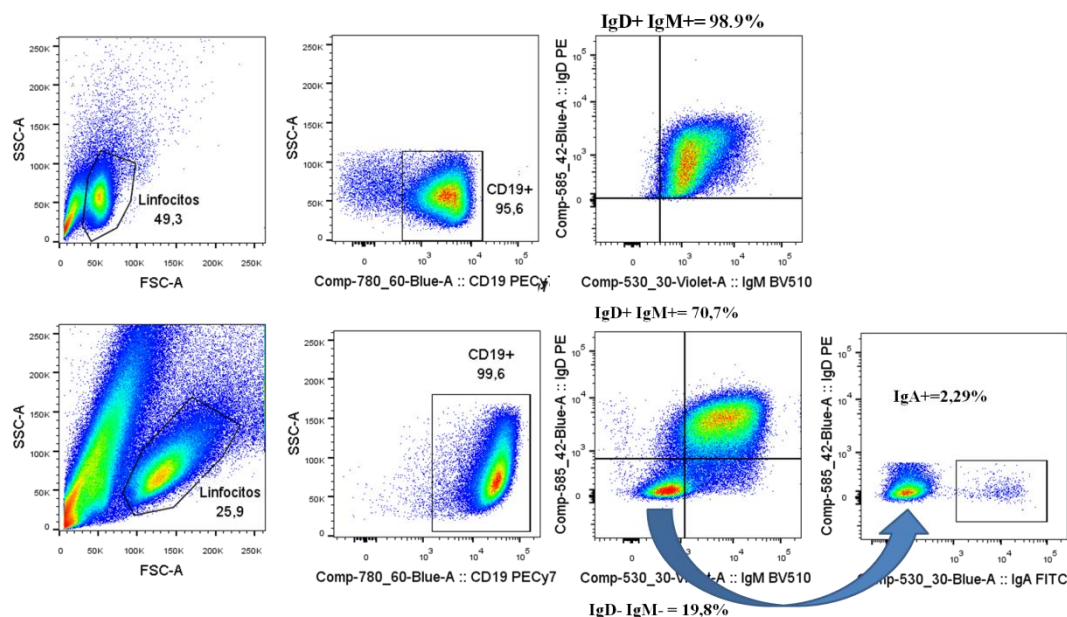


Figura 16: **a** células *Naive* no activadas mantenidas en cultivo durante 6 y 9 días, todas las *Naive* siguen expresando IgM e IgD; **b** células *Naive* activadas durante 6 y 9 días con CD40L e IL-21 sufren un aumento considerable del tamaño y empiezan a perder la IgM y la IgD; sobre esta población IgM⁻ IgD⁻ se seleccionan las células que han hecho el cambio a IgA⁺.

Pirosecuenciación con bisulfito

Se generan amplicones biotinilados para cada gen por PCR usando *HotStart Taq DNA polymerase PCR kit* (Qiagen) y cebadores específicos (Sigma Aldrich) diseñados con el programa de diseño de cebadores *PyroMark Assay Design Software* (Qiagen versión 2.0.01.15). Las reacciones de pirosecuenciación se realizaron en el *Pyromark Q24 system* (Qiagen).

Cada reacción de PCR consta de una mezcla que contiene 17,3 µl de agua, 2,5 µl de tampón 10x, 2,5 µl de dNTPs, 1 µl de Mg⁺, 0,5 µl de la correspondiente mezcla de cebadores (dilución 1:10 de los cebadores sentido y antisentido) y 0,2 µl de la enzima Taq polimerasa. De manera que cada reacción de PCR consta de 24 µl de la mezcla anterior y 1 µl de ADN modificado con bisulfito de cada muestra.

Para la reacción de PCR se realizan 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C 10 minutos, 95°C 30 segundos, temperatura específica de cada par de cebadores según el gen durante 30 segundos, 72°C 30 segundos, extensión final a 72°C durante 7 minutos y se mantiene finalmente a 4°C.

La Tabla 3 recoge las temperaturas óptimas de extensión de cada pareja de cebadores, así como la secuencia.

Para cada una de las muestras amplificadas por PCR con los correspondientes cebadores se comprueba la amplificación con un gel de agarosa al 2%, se cargan 5 µl del producto amplificado mezclado con 1 µl de marcador de ADN. Se transfiere a 120 voltios durante aproximadamente 10 minutos, para que las bandas se transfieran lo suficiente por el gel. Se visualizan las bandas y se comprueba que las muestras han amplificado, que los pares de bases son los correspondientes a cada producto amplificado y que en las muestras de agua que se utilizan como control negativo no haya amplificación.

En el caso de las muestras de las que no se consigue amplificación, se vuelve a amplificar cargando 1 µl del producto de la PCR amplificado y 24 µl de nueva mezcla de reacción, se volverá a visualizar la posible banda en un gel de agarosa al 2%.

Todas las muestras que hayan amplificado se lleva a cabo la reacción de pirosecuenciación para cada gen. Dicha reacción de pirosecuenciación requiere de procesado de las muestras amplificadas por PCR.

Lo primero es inmovilizar los productos de PCR biotinilados en partículas de estreptavidina cubiertas de sefarosa. Para ello en una nueva placa de 96 pocillos se mezclan 20 µl del producto amplificado por PCR de cada muestra y 20 µl de agua. Sobre los que se añaden 40 µl de la mezcla que contiene 38 µl del llamado tampón de unión (*Binding Buffer*) y 2 µl de sefarosa (contiene las partículas de estreptavidina cubiertas de sefarosa). Se tapa la placa con un plástico adhesivo y se deja en agitación constante durante al menos 5 minutos. Durante este tiempo de agitación se prepara la placa donde se llevará a cabo la reacción de secuenciación, llamada placa blanca, en cada pocillo correspondiente a cada muestra se añaden 12 µl de la mezcla que contiene 11,64 µl del tampón de fusión (*Annealing Buffer*) y 0,36 µl del correspondiente cebador de secuenciación.

Después se procede a la separación de las hebras de ADN, para ello la placa que se ha mantenido en agitación con la muestra y la sefarosa, se adsorbe mediante vacío con una estructura similar a un cepillo con 96 filtros donde quedarán retenidas las muestras. Teniendo cuidado de haber aspirado todas las muestras, se transfiere dicha

estructura con las muestras retenidas en los filtros a un recipiente que contiene etanol al 70% durante 5 segundos, a continuación se transfiere a un recipiente que contiene una solución denaturalizante (NaOH) durante 10 segundos y finalmente se transfiere durante 25 segundos a una solución de lavado. Se desconecta el vacío y con un movimiento rápido se deposita la estructura que contiene las muestras ya desnaturalizadas en los filtros sobre la placa blanca previamente preparada, donde se depositarán las muestras desnaturalizadas, cada filtro en su correspondiente pocillo de la placa de 96 pocillos. La placa blanca se calienta a 80°C durante 2 minutos, posteriormente se retira y se deja al menos 5 minutos a temperatura ambiente para a continuación iniciar la reacción de pirosecuenciación en el pirosecuenciador.

La pirosecuenciación consiste en una secuenciación por síntesis para el análisis cualitativo y cuantitativo en tiempo real de secuencias específicas de ADN con aplicaciones como el análisis de metilación, detección de mutaciones y polimorfismos.

El cebador de secuenciación se hibrida a la secuencia de ADN de una sola hebra amplificada por PCR. La secuencia se incuba con la enzima y el sustrato. La enzima ADN polimerasa incorporará los nucleótidos que se añaden a la reacción, siempre y cuando sean complementarios a la secuencia a analizar. La incorporación de cada nucleótido está acompañada de la liberación de pirofosfato en cantidad equimolar equivalente a la cantidad de nucleótido incorporado. El pirofosfato liberado se convierte en ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato, generándose una señal luminosa que después se detecta como un pico en el programa *Pyrogram* (Qiagen). Los resultados de pirosecuenciación con bisulfito se presentan como el porcentaje de metilación. Ya que el cebador específico detectará el polimorfismo C/T. Se detectan más C si está metilada, puesto que las C metiladas habrán permanecido como C a pesar de la modificación por bisulfito, y la mayor detección de T corresponden a muestras con menor metilación, ya que las T serán en origen C no metiladas que se habrán convertido a U por la modificación con bisulfito.

Tabla 3: CpG analizadas, se indica la temperatura óptima de los cebadores y sus secuencias, utilizados para la pirosecuenciación con bisulfito.

AKT (map info 105263522) Tm=60°C	Sentido GAGTTATTTGGGGTTTTTTTTGGGATTG Antisentido (biotinilado) AATTCCTTCCTCCATCCTTACATA Secuenciación ATTGTTTTATTTGTTTATTGTTTTT
AKT (map info 105264261) Tm=60°C	Sentido GAGTTTGTAGAGGTTTTGTTTGAATTATT Antisentido (biotinilado) ACCCTATAACTAACTAAATCTCAAATACA Secuenciación AGAGGTTTTGTTTGAATTATTA
AID (map info 8765336) Tm=58°C	Sentido GTTTTGAGAGGAAGGTTAGTGTA Antisentido (biotinilado) CAAAAAACACTCTAAACACCACTAT Secuenciación AGGAAGGTTAGTGTAAT
BCL 6 (map info 187468289) Tm=60°C	Sentido AGTTATTATATTGTTATTTGAGGTTAGAAG Antisentido (biotinilado) TTTTTTTTTCTCCCTACACTATACC Secuenciación GTTAGAAGATAGATATTTGGT
BCL 10 (map info 85745175) Tm=60°C	Sentido GGGTGGATGAGTAGAAAGAATA Antisentido (biotinilado) ATATAAAAAAACRCCAAACTAAACACC Secuenciación AGAAAGAATATTTAGGGGA
FOXO1 (map info 41238047) Tm=58°C	Sentido GTATTAATTATAGGGATGATATTGTGTGT Antisentido (biotinilado) ACTAAACACCTTTTTAAACATACCT Secuenciación AAAATAATTTTGGTGTTAATAATTG
MALT 1 (map info 56342012) Tm=60°C	Sentido TTGGTGTTAAAGATAGGAATTATAGTG TG Antisentido (biotinilado) ACAAATCCAATAACTAAAAAACACTTC Secuenciación GTTTAGTTCRTGTGGGTGA
NFKB2 (map info 104158842) Tm=56°C	Sentido AGGAGTTTAAAGATTAGTTTGGTTAATAG Antisentido (biotinilado) CTCAACTTACTACAACCTCTTATC Secuenciación AGTTGGGTATGGTGG
STAT 3 (map info 40543112) Tm=59°C	Sentido AGGTTGAGGGAAGAGAATTTT Antisentido (biotinilado) CCTACCTTAACCTCCTAAATAATTAAACT Secuenciación AGTAAAAATTAGTTAGTTATGGTG
TNFRSF13C (map info 42320732) Tm=60°C	Sentido GTTTAGGTTGTAATTAGTTGGGGATT Antisentido (biotinilado) AAATTTACCATATTAACCAAAATAATCTC Secuenciación ATTTTAGTATTTTGGGAGG

Ensayo para determinar el número de divisiones celulares que han sufrido las células (KREC)

Con las mismas muestras de ADN, utilizadas para los análisis de metilación, aisladas de las diferentes subpoblaciones B de pacientes y controles por separación con *sorting* se ha llevado a cabo un ensayo para determinar el número de divisiones celulares de esas poblaciones y también se ha analizado la frecuencia de las hipermutaciones somáticas que han sufrido las distintas subpoblaciones B: *Naive*, USm y Sm de pacientes y controles.

Este protocolo describe cómo cuantificar la historia replicativa de subpoblaciones B *Naive*, de memoria sin cambio de isotipo (USm) y de memoria con

cambio de isotipo (Sm) en ADN genómico, calculando el ratio entre los *coding joints* y los *signal joints* en los círculos que se escinden de la recombinación Kappa entre los segmentos IgK-K descrito por van Zelm et al ²³.

La recombinación V(D)J en el locus IGK resulta en una VJ κ llamada *coding joint*. Los reordenamientos entre el intrón RSS y los elementos K pueden dar lugar a un alelo IgK no funcional por delección de los exones C κ y los *enhancers*. Este locus IgK no funcional que evita cualquier reordenamiento en el locus IgK y el *coding joint* generado permanece estable en el genoma. El ADN situado entre estos dos elementos que reordenan se escinde del genoma se recirculariza en unas estructuras episomales estables (denominado KREC con el *signal joint*) que se irán diluyendo dos veces en cada división celular. El *coding joint* en el genoma y el *signal joint* en el círculo de excisión episomal se pueden cuantificar por Q-PCR.

Para cuantificarlo se procede de la siguiente forma, cuando un linfocito B con el reordenamiento intrón RSS-K se divide, cada célula hija recibe un *coding joint* en el genoma, sin embargo el *signal joint* que es el episoma KREC, será heredado sólo por una de las células hijas. Por lo que la diferencia de ciclo de PCR en el que amplifica o se detecta el *coding joint* y el *signal joint* representa exactamente el número de divisiones celulares que han sufrido, porque ambos procesos tienen un incremento exponencial en base 2.

La detección del número de divisiones celulares se realiza por Q-PCR usando cebadores específicos. La diferencia de los valores de Ct (el ciclo de amplificación) mide el número de divisiones celulares B que han sufrido de media cada población desde su diferenciación en médula ósea. La diferencia de valores Ct se normalizan usando una línea celular estable que no ha sufrido divisiones celulares y que por tanto tiene un valor menor de una división celular.

Ensayo de las hipermutaciones somáticas (IgK REHMA)

El análisis de las hipermutaciones somáticas que sufren las diferentes subpoblaciones B de pacientes con IDCV y controles se detecta con el ensayo de mutaciones en los segmentos IgK con enzimas de restricción.

Este método descrito por van Zelm et al ²³, analiza el porcentaje de segmentos génicos Vκ3-20 (VκA27) reordenados que contienen hipermutaciones somáticas en una secuencia específica. Se amplifica dicha secuencia de ADN por PCR con cebadores específicos del intrón Vκ 3-20 y dos cebadores Jκ que reconocen los cinco fragmentos génicos Jκ. Parte del producto de PCR se reserva para visualizar en un gel de agarosa el tamaño de la banda que nos interesa de 500 pares de bases (pb). Una vez confirmado el tamaño de la banda amplificada, el resto del producto de PCR obtenido, se digiere con dos enzimas de digestión Fnu4HI y Kpn1. El tamaño de los fragmentos génicos se analiza en un secuenciador de capilares ABI 3130xl (Applied Biosystems).

Los productos génicos mutados que han sufrido hipermutación somática se detectan a 262 pb, mientras que los segmentos génicos no mutados se observan a 244 y 247 pb.

Análisis estadístico

El estado de metilación B de las subpoblaciones de pacientes con IDCV y controles se analiza en el paquete estadístico Graphpad 6 usando el test no paramétrico Mann Whitney y correlación de Spearman con valores de significación para *P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; *** P-valor <0,001; **** P-valor <0,0001.

Los resultados de metilación están representados como porcentaje de metilación de cada muestra, agrupados dentro de una caja que representa la media y el EEM del conjunto de datos.

Resultados

Resultados

Características clínicas de los pacientes

Un total de 57 pacientes han sido incluidos en este estudio, 29 mujeres y 28 hombres. La edad media de los pacientes es de 43 años, con una media de edad al diagnóstico de 32 años. Si subdividimos en función del sexo, de media las mujeres tienen 49 años y los hombres 38 años. La edad media de diagnóstico de los hombres es de 25 años, inferior a la de las mujeres, 38 años, tal y como ha quedado recogido en otros estudios a nivel europeo ¹²⁵.

Todos los pacientes incluidos en los diferentes estudios están con tratamiento sustitutivo con gammaglobulina intravenosa en la mayoría de los casos, un pequeño porcentaje recibe el tratamiento de forma subcutánea.

Se presentan los datos clínicos y de fenotipo B del total de la cohorte estudiada, en la Figura 17 se representa el porcentaje de complicaciones clínicas por tipos, que han presentado los pacientes (cohorte de 57 pacientes). Y en la Figura 18 se desglosan en detalle cada tipo de complicación.

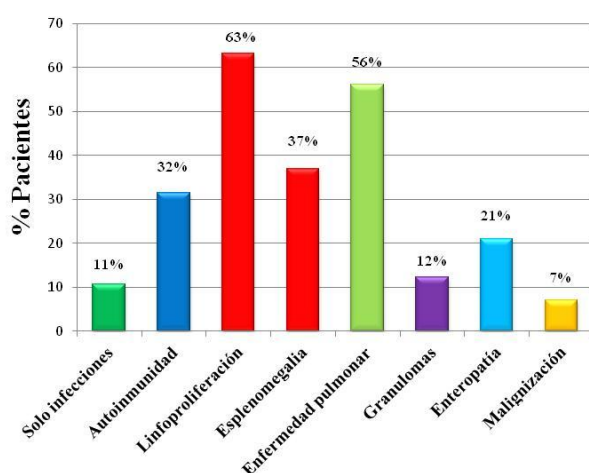


Figura 17: Frecuencia de las complicaciones observadas en los pacientes IDCV incluidos en este estudio.

En cuanto a la distribución de subpoblaciones B de los pacientes (fenotipo B) cabe destacar un paciente con distribución atípica de las células B, casi la mitad de ellas son CD19⁺ IgM⁺ IgD⁻ con prácticamente ausencia de células B de memoria y una gran expansión de células CD21^{low}. El resto de pacientes, de acuerdo con los valores de normalidad establecidos en el *Euroclass Trial* ¹²⁶ (Tabla 4), el 25% de los pacientes

tienen menos células B en periferia (pero todos más de 1% de linfocitos B totales). El 45% de los pacientes presentan células USm por debajo de la normalidad, el 85% de los pacientes presentan reducción de células Sm y de ellos el 60% presentan menos de 2% de células Sm. El 22% de los pacientes presentan expansión de células transicionales (más del 9%) y el 29% de los pacientes presentan más de 10% de células CD21*low* (Figura 19).

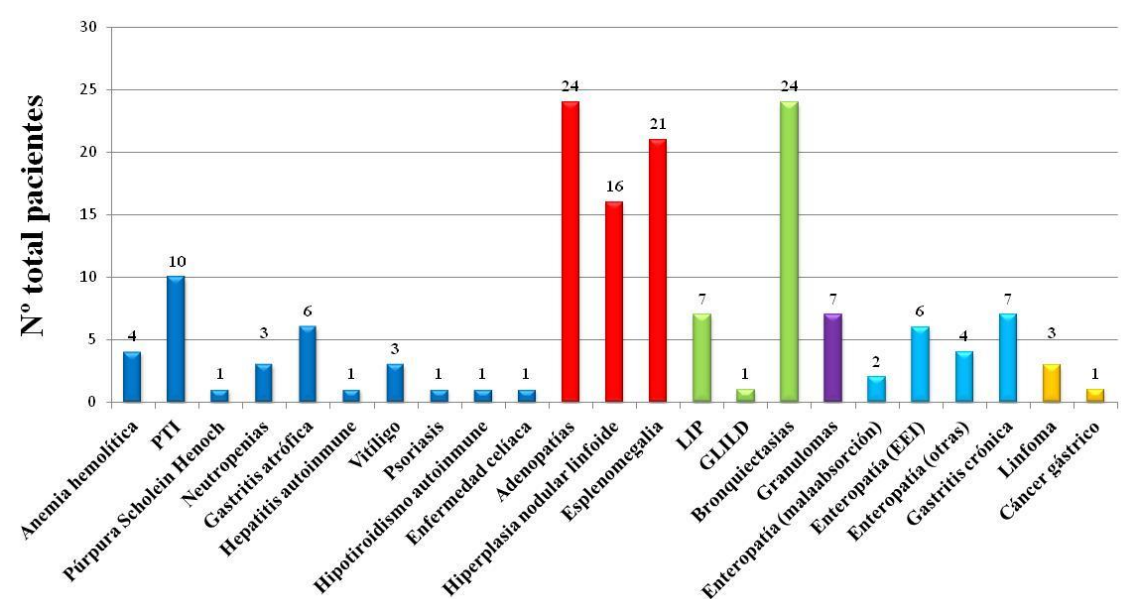


Figura 18: Descripción del número de pacientes que presentan complicaciones clínicas, en azul las complicaciones autoinmunes, en rojo las complicaciones linfoproliferativas, en verde las complicaciones pulmonares, en morado presencia de granulomas, en azul claro las complicaciones intestinales y en amarillo las malignizaciones.

Tabla 4: Rangos de normalidad establecidos en el *Euroclass Trial* (Wehr et al, 2007¹²⁶).

Población B	Rango normalidad
B totales (%)	6-19 (%)
USm CD27+ IgM+ IgD+	7,2-30,8 (%)
Sm CD27+ IgM- IgD-	6,5-29,2 (%)
Transicionales	0,6-3,5 (%)
CD38++ IgM++	
CD21 <i>low</i>	1,1-6,9 (%)
Plasmablastos	
CD38+++ IgM-	0,4-3,6 (%)

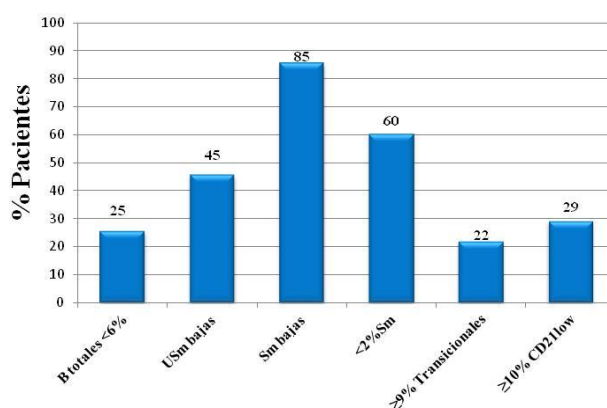


Figura 19: Frecuencia de los pacientes IDCv según la distribución de subpoblaciones B.

Los grupos de pacientes analizados en cada experimento son representativos del total de la cohorte, con frecuencias parecidas tanto en la distribución de complicaciones como en las subpoblaciones B (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencias de las complicaciones clínicas y de subpoblaciones B en los diferentes grupos de pacientes analizados en distintos experimentos.

Complicaciones	Total cohorte	Bcl-2 proteína	Bcl-xl proteína	ARNm Naive activadas	Fosforilaciones (Akt y S6)	microARNs	Metilación ADN
Autoinmunidad	32%	16%	27%	22%	30%	30%	19%
Linfoproliferación	63%	48%	65%	59%	59%	61%	48%
Esplenomegalia	37%	26%	41%	33%	37%	35%	37%
Bronquiectasias	56%	35%	49%	56%	48%	35%	37%
Granulomas	12%	19%	5%	4%	4%	9%	4%
Enteropatía	21%	10%	22%	27%	11%	17%	15%
Malignización	7%	3%	11%	7%	0%	9%	7%

Subpoblaciones B	Total cohorte	Bcl-2 proteína	Bcl-xl proteína	ARNm Naive activadas	Fosforilaciones (Akt y S6)	microARNs	Metilación ADN
USm bajas	45%	29%	43%	37%	52%	43%	33%
Sm bajas	85%	74%	84%	74%	93%	78%	67%
Sm (<2%)	60%	42%	54%	48%	56%	52%	48%
Transicionales (≥9%)	22%	10%	24%	19%	22%	22%	19%
CD21 low (≥10%)	29%	23%	27%	22%	22%	35%	15%

El bloque experimental I de señalización intracelular aborda los dos primeros objetivos específicos. El bloque experimental II de análisis de expresión de microARNs corresponde al tercer objetivo específico y el bloque experimental III de análisis de metilación del ADN aborda el cuarto y último objetivo específico.

Bloque experimental I: Señalización intracelular linfocito B

Detección de la proteína intracelular Bcl-2

Se han analizado los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las subpoblaciones B *Naive*, USm y Sm en 43 pacientes diagnosticados de IDCV y 41 controles sanos. Los linfocitos B de los pacientes con IDCV muestran una menor expresión de Bcl-2 tanto en las células USm como en las células Sm (P-valor=0,0021) con respecto a los controles sanos (Figura 20). Las células B de los controles muestran un incremento en la expresión de Bcl-2 en la transición desde las células *Naive* hasta células Sm. Dicho incremento está reducido en los linfocitos B de los pacientes con IDCV (P-valor <0,0001) (Figura 21).

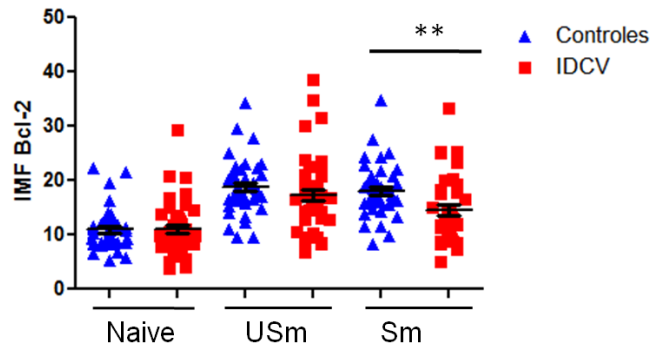


Figura 20 Niveles de expresión de la proteína intracelular Bcl-2: Se representan las IMF en las distintas subpoblaciones *Naive*, USm y Sm de controles y pacientes IDCV con el EEM (** P-valor <0,01 test Mann-Whitney).

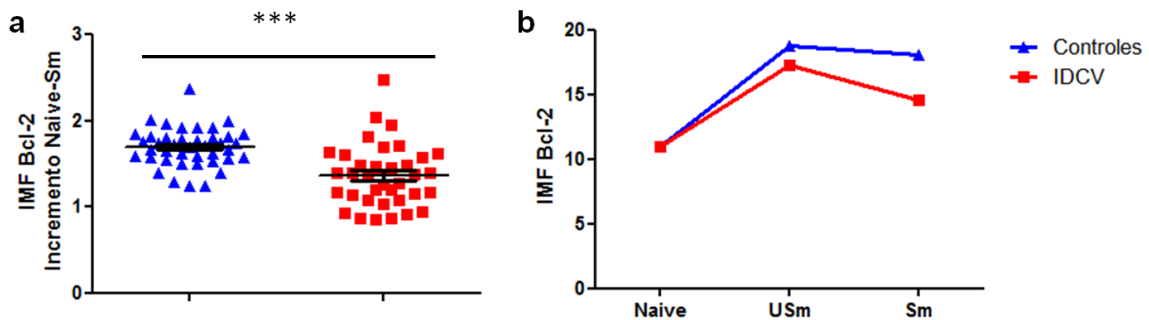


Figura 21 Incremento de la expresión de Bcl-2: **a** incremento en la transición entre células *Naive* y Sm analizado como la diferencia de IMF de las células Sm y las *Naive* con EEM (***) P-valor <0,001; test Mann-Whitney). **b** Medias de las IMF de los grupos control y IDCV.

Cuando se subdividen los pacientes con IDCV en función de su fenotipo de células B (Figura 22), los pacientes con reducción por debajo de los rangos de normalidad para los linfocitos B USm y Sm tienen menor expresión de Bcl-2 en las células Sm (P-valor=0,0567) (Figura 22 a). Cuando presentan reducción de células Sm severa (<2%) la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 está disminuida tanto en los linfocitos USm (P-valor=0,0431) como en los linfocitos Sm (P-valor=0,0202) (Figura 22 b). Los pacientes con expansión de células transicionales (>9%) no presentan diferencias con respecto a los controles para ninguna de las subpoblaciones y expresión Bcl-2 (Figura 22 c). Y por último, los pacientes con expansión de células CD21*low* (>10%) presentan unos niveles de Bcl-2 menores que los controles en la subpoblación Sm (p-valor=0,0100) (Figura 22 d).

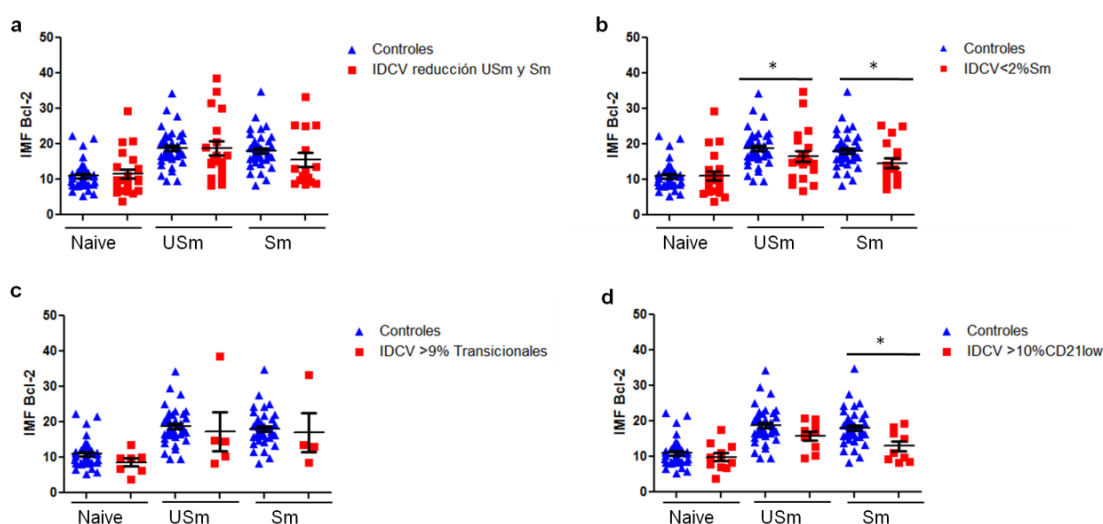


Figura 22 Niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 según las características de fenotipo B: **a** IDCV con disminución tanto de las células USm como Sm; **b** IDCV disminución severa de las Sm (<2%), **c** IDCV con expansión de células transicionales (>9%) y **d** IDCV con expansión de células CD21*low* (>10%). Se representa IMF de cada muestra con media y EEM (* P-valor <0,05; test Mann-Whitney).

Detección de la proteína intracelular Bcl-xl

Bcl-xl es una proteína antiapoptótica que a la vista de nuestros resultados en controles sanos, tiene mayor relevancia en los primeros estadios de diferenciación de la célula B en periferia. Bcl-xl se incrementa en la transición entre células B *Naive* a USm, sin embargo no parece que la expresión de Bcl-xl sea relevante para la diferenciación

terminal hacia células Sm (Figura 23). Para este estudio se han incluido 27 controles sanos y 37 pacientes.

No observamos diferencias en la expresión de la proteína Bcl-xl, entre pacientes y controles en ninguna subpoblación B (Figura 23a), ni la proteína antiapoptótica Bcl-xl sigue el patrón de incremento en la transición a células B de memoria que sí se observaba para Bcl-2. Las células *Naive* de los pacientes IDCV muestran una mayor expresión de Bcl-xl que los controles sanos. En ambos grupos se observa cómo Bcl-xl tiende a disminuir en la transición hacia células Sm (Figura 23 b).

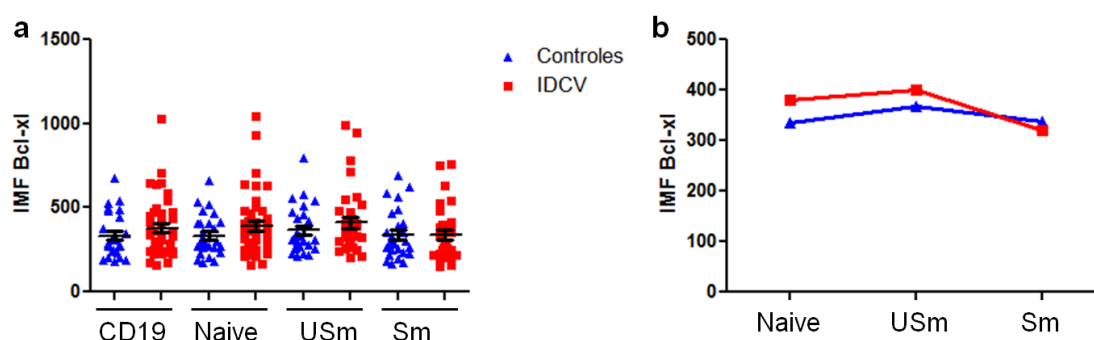


Figura 23 Niveles de expresión de la proteína intracelular Bcl-xl: **a** Media de las IMF de la proteína Bcl-xl del grupo control y del grupo de pacientes IDCV con EMM. **b** Niveles medios de expresión de Bcl-xl en las subpoblaciones B.

Si se subdividen los pacientes IDCV en función de su fenotipo B, reducción de ambas subpoblaciones de memoria por debajo de los límites normalidad para las células USm y Sm, reducción solo de células Sm, reducción severa de células Sm <2%, expansión de células transicionales (>9%) y expansión de células CD21*low* (>10%). Solo se aprecia que las células *Naive* y USm de los pacientes con reducción de subpoblaciones de memoria (USm y Sm) presentan niveles medios de expresión de la proteína Bcl-xl más altos que los controles. Este subgrupo de pacientes con reducción de células de memoria, expresa niveles más elevados de Bcl-xl tanto en la población *Naive* (P-valor=0,0232) como para la población USm (P-valor=0,0414) con respecto al subgrupo de pacientes IDCV que presentan una distribución de fenotipo B normal (Figura 24 a). En la Figura 24 b se muestra la tendencia de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xl en la transición de linfocitos B *Naive* a linfocitos Sm, observándose la mayor expresión de Bcl-xl en los pacientes con reducción de las subpoblaciones de memoria.

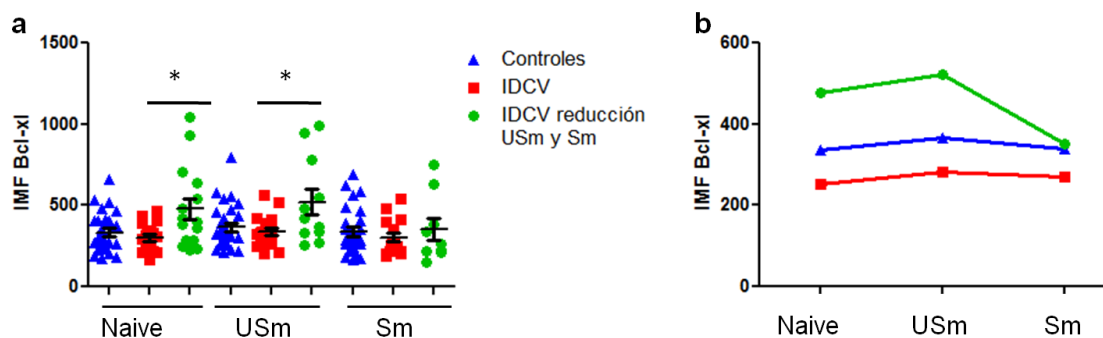


Figura 24 Niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xl según las características de fenotipo B: **a** Expresión de Bcl-xl en controles, pacientes IDCV con fenotipo normal y pacientes con reducción de las subpoblaciones B de memoria, representado como IMF con EEM; **b** Tendencia de expresión de Bcl-xl en la transición de células *Naive* a células *Sm* (* P-valor <0,05; test Mann Whitney).

Expresión de ARNm en células *Naive* activadas *in vitro* con CD40L e IL-21 durante 4 días.

Para este estudio de activación de células *Naive*, se han incluido 16 controles sanos y 20 pacientes. Todas las muestras de pacientes y controles presentaban un enriquecimiento en células *Naive* mayor del 50%. Con una media de enriquecimiento del 75% de células CD19⁺ para los IDCV y de 78% para los controles. Dentro de las células CD19⁺ en ambos casos la pureza media de las células *Naive* es del 96%. En ambos grupos la presencia de linfocitos CD3⁺ es de media un 6% (Figura 25).

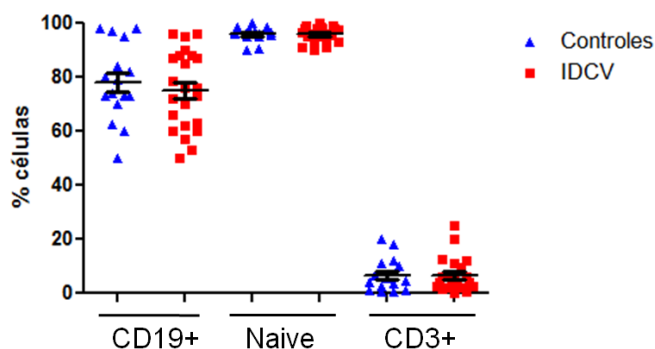


Figura 25: Pureza de las células *Naive* activadas *in vitro*. Se expresan los porcentajes de células CD19+ totales purificadas a día 0, así como de células B *Naive* y las células CD3+ presentes en cultivo a día 0 (media y EEM).

Como control interno de activación de las células *Naive* mantenidas en cultivo durante 4 días, se analizan los marcadores de activación CD69 y CD86 por citometría de flujo. Se representa el incremento de CD69 y CD86 a partir de las IMF obtenidas en las células activadas con respecto a las células no activadas (Figura 26). Los linfocitos B *Naive* tanto de pacientes IDCV como de controles son capaces de aumentar la expresión de CD69 y CD86 tras 4 días de estimulación *in vitro* con CD40L e IL-21. No observando diferencias en la expresión de dichos marcadores entre pacientes y controles.

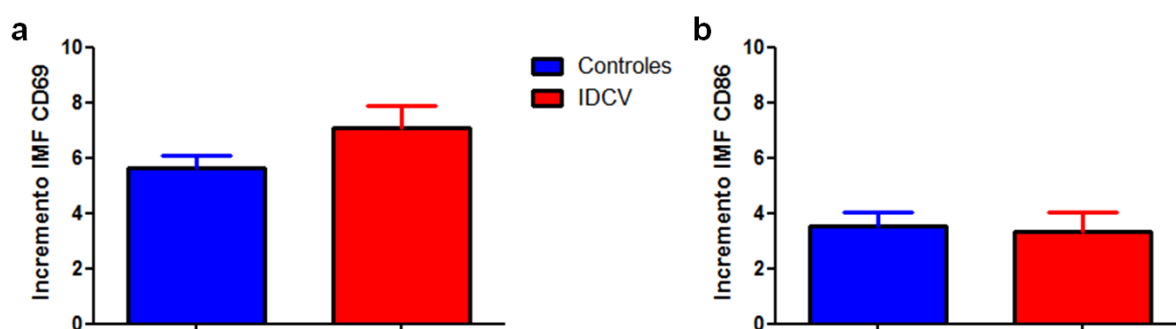


Figura 26 Incremento de la IMF de CD69 y CD86: En las células *Naive* activadas con CD40L e IL-21 con respecto a las células *Naive* no activadas en pacientes IDCV y controles (Media y EEM).

El incremento de la expresión relativa del ARNm de la proteína Bcl-2, está reducido en las células *Naive* de los pacientes IDCV tras 4 días de activación de células *Naive* (+CD40L+IL-21) comparado con los controles sanos. Aunque los linfocitos B *Naive* de los pacientes incrementan la expresión de *BCL-2* desde un estado de no activación a estado de activación *in vitro*, no lo hacen al nivel de los linfocitos B *Naive* de los controles sanos (Figura 27). No se aprecian diferencias significativas cuando se subdividen los pacientes IDCV en función de su fenotipo B.

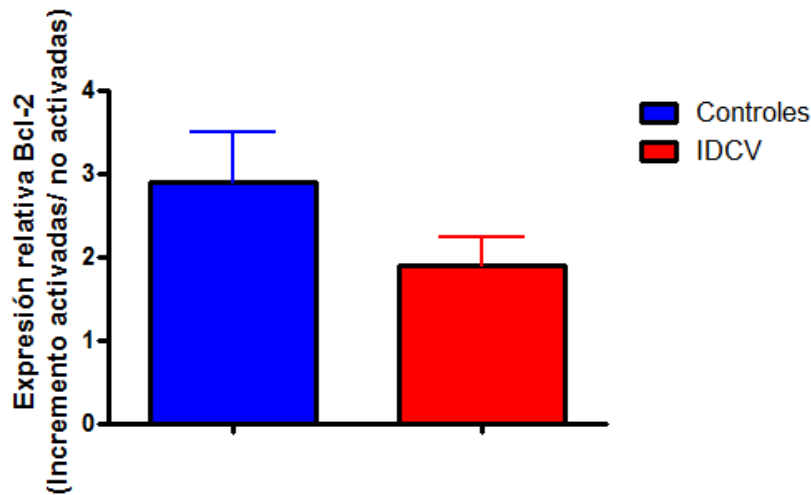


Figura 27: Expresión relativa del ARNm de *BCL-2* tras activación de células *Naive* en controles y pacientes IDCV (Media y EEM).

En el caso del ARNm de la proteína antiapoptótica Bcl-xl los linfocitos B *Naive* de los pacientes IDCV presentan una reducción significativa (P-valor=0,0371) en la capacidad de incrementar la expresión de *BCL-XL* tras 4 días de activación *in vitro* (Figura 28). Se observa una reducción más significativa en la expresión de *BCL-XL*, en aquellos pacientes con números de células B de memoria (USm y Sm) por debajo del rango de normalidad, P-valor=0,0186 (Figura 29).

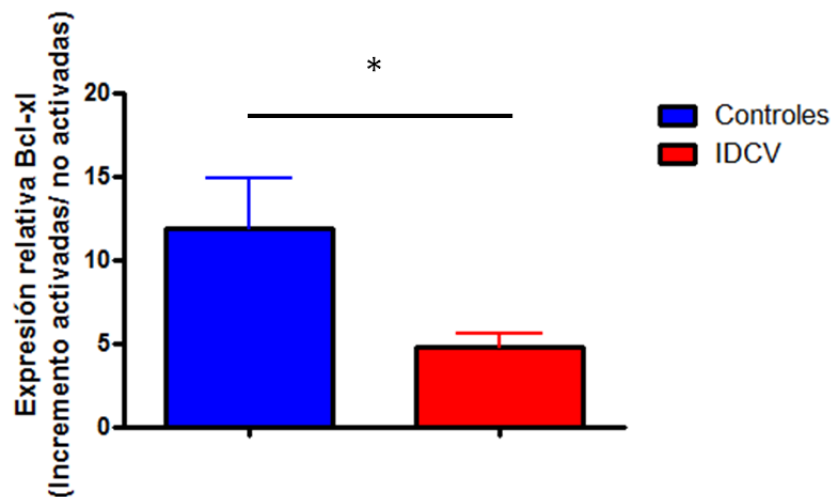


Figura 28: Expresión relativa del ARNm de *BCL-XL* tras activación de células *Naive* en controles y pacientes IDCV (media y EEM), se observan diferencias significativas (P-valor=0,0371) entre ambos grupos (* P-valor <0,05; test Mann-Whitney).

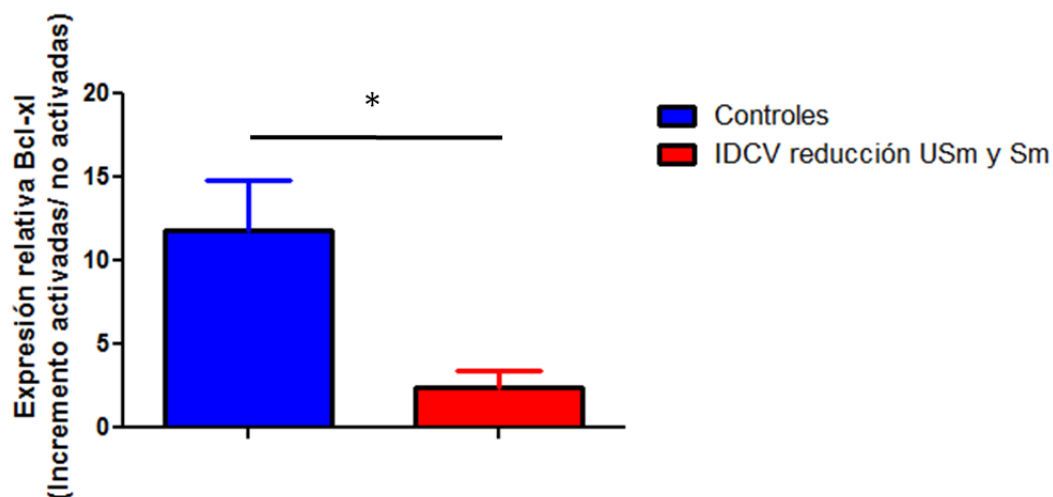


Figura 29: Expresión relativa del ARNm de *BCL-XL* tras activación de células *Naive* en controles y pacientes IDCV con reducción de las subpoblaciones de memoria (media y EEM) (* P-valor <0,05; test Mann-Whitney).

AID se incluyó en el estudio como control positivo de activación, *AID* sólo se expresa tras activación e *in vivo* es necesario para que ocurra la reacción del centro germinal. Tanto las células *Naive* de los pacientes IDCV como controles son capaces de expresar *AID* tras activación con CD40L e IL-21 durante 4 días *in vitro*. Sin embargo, se aprecian diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de *AID* entre controles y pacientes IDCV (P-valor=0,019) (Figura 30). Además se observa que dentro del grupo de pacientes IDCV hay variabilidad en la expresión de *AID*.

Para tratar de entender la variabilidad entre pacientes se llevaron a cabo distintos análisis subdividiendo el grupo de pacientes en base a la distribución del fenotipo B que presenten (Figura 31). Para *AID* la variabilidad en la expresión puede deberse porque en aquellos pacientes con reducción de linfocitos USm y Sm, por debajo del rango de normalidad, presentan una disminución más severa de los niveles de expresión de *AID* tras activación con respecto al grupo control (P-valor=0,0287) (Figura 31 a). En aquellos pacientes con reducción significativa de linfocitos Sm, también expresan menos niveles de *AID* tras activación que los controles (P-valor=0,0026) (Figura 31 b).

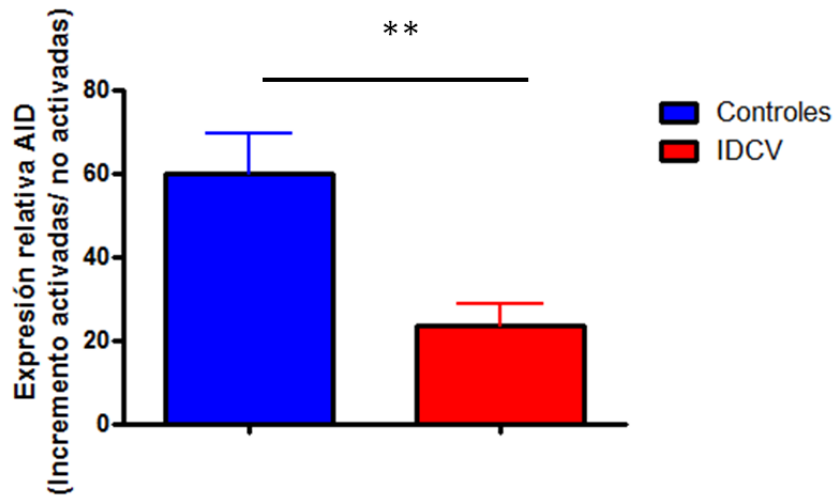


Figura 30: Expresión relativa del ARNm de *AID* tras activación de células *Naive* en controles y pacientes IDCV (media y EMM), se observan diferencias significativas (P-valor=0,0019) en la expresión relativa de *AID* entre pacientes IDCV y controles (** P-valor <0,01; test Mann-Whitney).

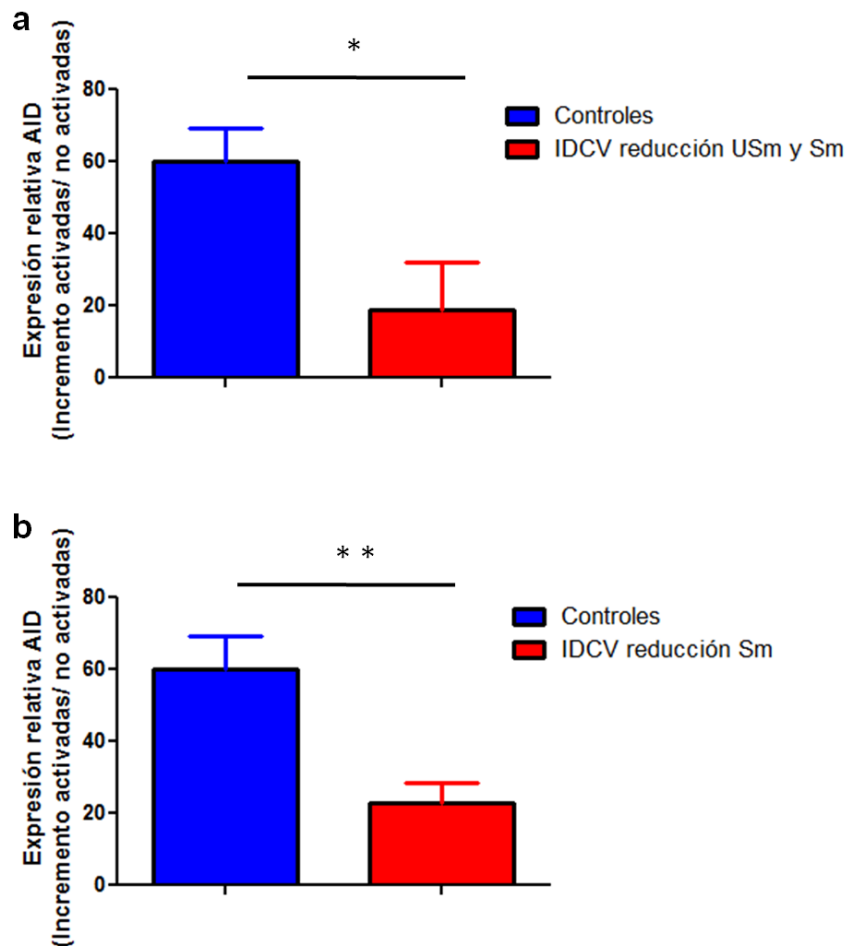


Figura 31: Expresión relativa del ARNm de *AID* tras activación de células *Naive* en controles y pacientes IDCV clasificados según el fenotipo B (media y EMM) **a** IDCV con reducción de linfocitos USm y Sm; **b** IDCV con reducción de linfocitos Sm (* P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; test Mann-Whitney).

La expresión de los ARNm de *BCL-2* y *BCL-XL* se induce por la activación de la vía de NFκB. Nuestro sistema de activación *in vitro* de células *Naive* con CD40L e IL-21 induce la expresión de los ARNm de ambas proteínas, observándose una correlación positiva y significativa en el grupo control (coeficiente r de Spearman=0,900; P-valor <0,0001) pero no para en los linfocitos B *Naive* de pacientes con IDCV (coeficiente r de Spearman=0,2962; P-valor=0,2047) (Figura 32).

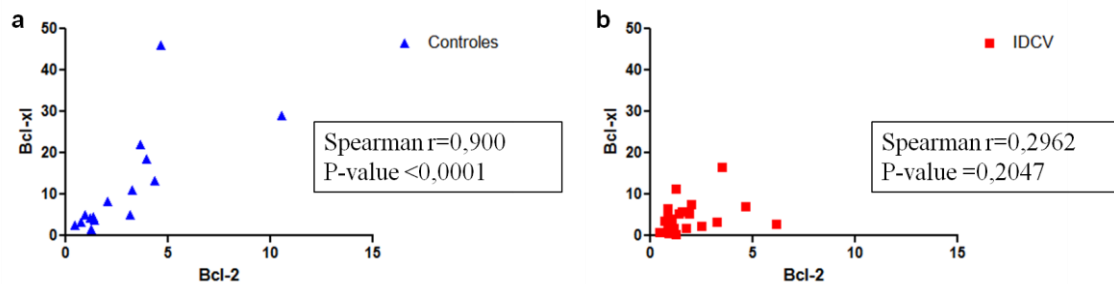


Figura 32: Inducción de la expresión de los ARNm de *BCL-2* y *BCL-XL* en células *Naive* activadas: **a** controles; **b** pacientes IDCV.

Señalización intracelular proteínas Akt y S6:

Akt y S6: niveles totales de proteínas intracelulares

Se analizan por citometría de flujo los niveles de proteína de Akt y S6 en células CD19⁺ totales, *Naive*, USm y Sm, en 19 controles sanos y 25 pacientes con IDCV. Los niveles de expresión de ambas proteínas son similares, no observándose diferencias en las IMF para ninguna subpoblación entre pacientes IDCV y controles (Figura 33).

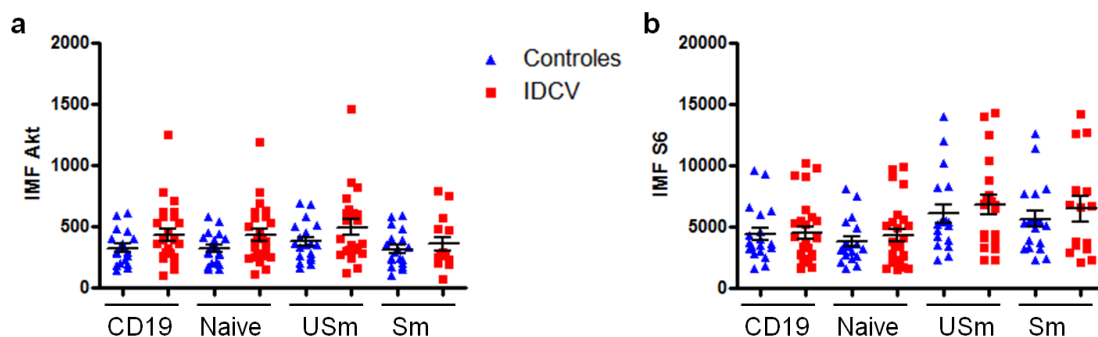


Figura 33: **a** Niveles totales de la proteína Akt y **b** de la proteína S6 en distintas subpoblaciones B de controles y pacientes IDCV. Representado como IMF con media y EEM.

Señalización de proteínas fosforiladas Akt y S6:

Se ha diseñado un experimento de activación de PBMCs con anti IgM siguiendo una cinética de activación a distintos tiempos 5, 10 y 15 minutos para detectar la fosforilación de las proteínas Akt y S6 con respecto a la fosforilación basal de las mismas muestras no activadas.

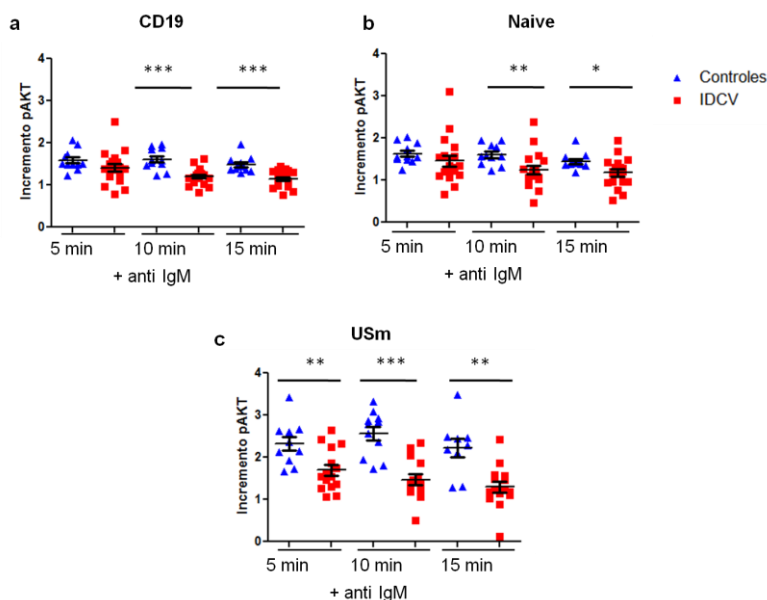


Figura 34: Incremento de los niveles de fosforilación de Akt a distintos tiempos de estimulación con anti IgM a 5,10 y 15 minutos con respecto a la fosforilación basal de las muestras no estimuladas (Incremento IMF con media y EMM), **a** fosforilación de Akt en células B totales CD19⁺; **b** fosforilación de Akt en células *Naive* y **c** fosforilación de Akt en células USm en controles y los pacientes IDCV (* P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; *** P-valor <0,001; test Mann-Whitney).

Se ha analizado la fosforilación de Akt (p Akt) en células B CD19⁺ totales, *Naive* y USm en un total de 11 controles sanos y 18 pacientes. Las subpoblaciones B que van a responder a la estimulación con anti IgM son los linfocitos CD19⁺ totales, los linfocitos B *Naive* y los linfocitos USm que presentan en su membrana receptores de tipo IgM. En las células CD19⁺ totales se observa una disminución de la fosforilación de Akt en los pacientes IDCV con respecto al grupo control a los 10 minutos de activación (P-valor=0,0008) y a los 15 minutos de activación (P-valor=0,003) (Figura 34a). Se obtienen resultados muy parecidos para los linfocitos *Naive*, que representan la población mayoritaria del total de linfocitos CD19⁺. Se observa menor fosforilación de Akt en los linfocitos B *Naive* de los pacientes a los 10 minutos de activación (P-valor=0,0043) y a los 15 minutos (P-valor=0,0206) (Figura 34b).

Para las células USm de los pacientes IDCV se observan defectos en la fosforilación de Akt en todos los tiempos estudiados a 5, 10 y 15 minutos de activación respectivamente (P-valor=0,0099; P-valor=0,0002; P-valor=0,0019) (Figura 34c).

Se han subdividido los pacientes por complicaciones clínicas relevantes que pudieran guardar una asociación patogénica con la función de Akt como son los procesos autoinmunes y linfoproliferativos. Dentro de los pacientes IDCV de este análisis hay 5 pacientes con procesos autoinmunes (Figura 35). En general los pacientes siguen presentando niveles reducidos de fosforilación de Akt independientemente de las complicaciones con respecto a los controles sanos tal y como ha quedado reflejado previamente teniendo en cuenta todo el grupo de pacientes. En células CD19⁺ totales, los pacientes con autoinmunidad presentan niveles de fosforilación de Akt tras 10 minutos de activación superiores con respecto al resto de pacientes sin dicha complicación (P-valor= 0,0487) (Figura 35 a), a los 15 minutos de estimulación con anti IgM las células CD19⁺ de los IDCV con procesos autoinmunes tienen menos fosforilación de Akt con respecto a los controles sanos (P-valor= 0,0314), pero no hay diferencias con respecto al otro subgrupo de pacientes IDCV (Figura 35 a). Y los pacientes sin autoinmunidad siguen presentando menos fosforilación de Akt con respecto a los controles a los 10 y 15 minutos de activación, respectivamente (P-valor=0,0006 y P-valor=0,0004).

Para las células *Naive*, no hay diferencias entre los subgrupos de IDCV a pesar de las complicaciones autoinmunes. Los linfocitos B *Naive* de los pacientes siguen presentando niveles inferiores de fosforilación de Akt, en concreto los pacientes con autoinmunidad tienen menos fosforilación de Akt a los 5 min (P-valor=0,0414) 10 min (P-valor= 0,0092) con respecto a controles sanos. Y los linfocitos B *Naive* del subgrupo de pacientes sin autoinmunidad también presentan diferencias con respecto al grupo control, a los 10 y 15 min respectivamente (P-valor=0,0205 y P-valor=0,0239) (Figura 35 b). En los linfocitos USm en general todos los pacientes siguen presentando menos fosforilación de Akt con respecto a los controles sanos, no observándose diferencias entre los subgrupos de pacientes. Los pacientes con autoinmunidad presentan menos fosforilación en las células USm con respecto a los controles sanos a 10 y 15 min respectivamente (P-valor=0,0127 y P-valor=0,0120), al igual que los pacientes sin autoinmunidad las células USm presentan también defectos en la fosforilación a los 5,

10 y 15 minutos de estimulación con anti IgM en comparación a los controles sanos (P-valor= 0,0052; P-valor=0,0006 y P-valor=0,0041).

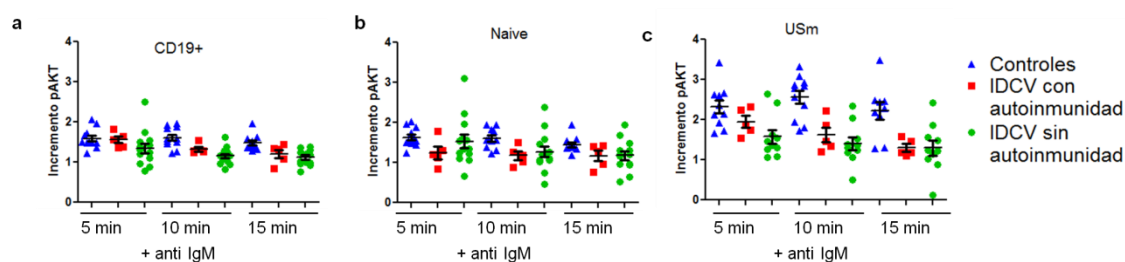


Figura 35: Niveles de fosforilación de Akt siguiendo cinética de activación con anti IgM a distintos tiempos en **a** linfocitos CD19+, **b** *Naive* y **c** USm, en controles sanos, pacientes IDCV y pacientes IDCV que presentan complicaciones autoinmunes (Incrementos IMF con media y EMM). No se indican la significación porque no se observan diferencias entre subgrupos IDCV; P-valor test Mann-Whitney referidos en el texto.

Los pacientes con fenómenos linfoproliferativos son prácticamente todos los analizados en el estudio de fosforilación de Akt, a excepción de 6 pacientes con IDCV que no presentan ningún tipo de linfoproliferación (Figura 36). No hay diferencias entre los subgrupos de pacientes para las células CD19⁺. Sí que siguen existiendo diferencias significativas como cuando se consideró anteriormente todo el grupo de IDCV en su conjunto. Los pacientes con linfoproliferación presentan menos fosforilación de Akt en las células CD19⁺ a los 10 minutos de estimulación (P-valor= 0,0028) y a los 15 minutos (P-valor=0,0010) con respecto a los controles (Figura 36 a), al igual que los pacientes sin linfoproliferación tienen diferencias con respecto a los controles a los 10 y 15 min respectivamente (P-valor=0,0104 y P-valor=0,0077). Para las células *Naive* tampoco se observan diferencias entre los subgrupos de pacientes según tengan o no fenómenos de linfoproliferación. Aunque sí se observan diferencias pacientes con linfoproliferación tienen menos fosforilación de Akt que los controles a los 5, 10 y 15 min respectivamente (P-valor= 0,0337; P-valor= 0,0028; P-valor= 0,0178) (Figura 36 b). Las células USm de los pacientes con linfoproliferación presentan una fosforilación de Akt ligeramente elevada con respecto a los pacientes sin dicha complicación, aunque no llega a haber significación estadística entre los dos subgrupos de pacientes IDCV. Sin embargo, con respecto a los controles los pacientes con linfoproliferación presentan también defectos en la fosforilación a los 5, 10 y 15 min respectivamente (P-valor= 0,0435; P-valor= 0,0018; P-valor= 0,0078) (Figura 36 c). Pero tampoco suponen diferencias con respecto a lo observado de todo el grupo de IDCV en conjunto. Puesto que los pacientes IDCV sin linfoproliferación también tienen menos fosforilación de

Akt que los controles fosforilación a los 5, 10 y 15 min respectivamente (P-valor= 0,0160; P-valor= 0,0030; P-valor= 0,0048) (Figura 36 c).

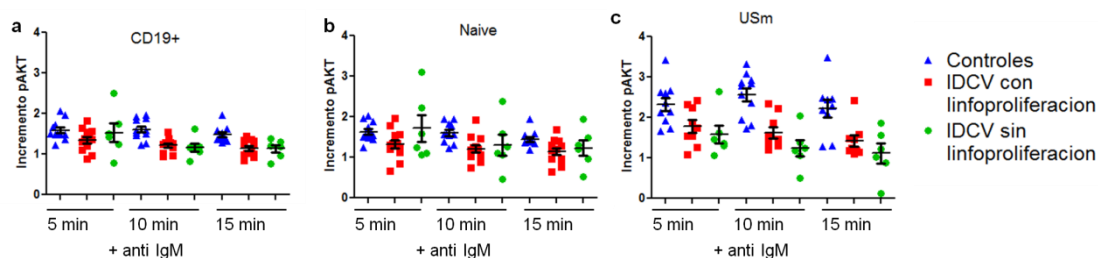


Figura 36: Niveles de fosforilación de Akt siguiendo cinética de activación con anti IgM a distintos tiempos en **a** linfocitos CD19+, **b** Naive y **c** USm, en controles sanos, pacientes IDCV con complicaciones de tipo linfoproliferativa y pacientes IDCV sin dicha complicación (Incrementos IMF con media y EMM). No se indican la significación porque no se observan diferencias entre subgrupos IDCV, P-valor test Mann-Whitney referidos en el texto.

Cabe destacar que hay 5 pacientes con una fosforilación basal incrementada (más de 2SD de la media de los controles sanos) (Figura 37). Sin embargo la cinética de activación se comporta como la del resto de pacientes con IDCV.

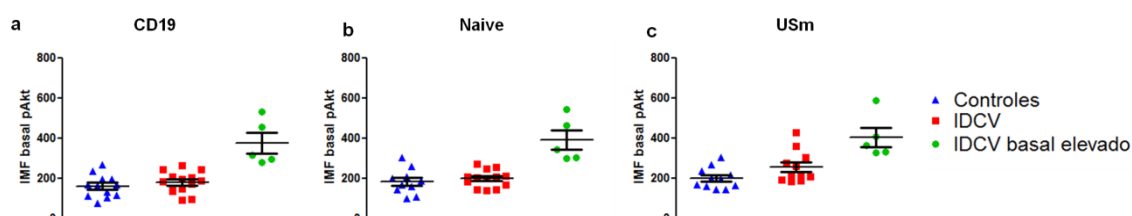


Figura 37: IMF de la fosforilación basal de Akt en controles (azul), IDCV (rojo) y IDCV con fosforilación basal incrementada (≥ 2 SD media controles en verde) (media y EEM).

El estudio de la fosforilación de Akt además es de gran utilidad para la identificación de otras mutaciones recientemente descritas en la vía de PI3K, en concreto hemos detectado fosforilación basal de Akt incrementada en pacientes con mutaciones en *PIK3CD*, *PI3KR1* y *PTEN*. Estas mutaciones han sido descritas en el transcurso de esta tesis doctoral y entre los pacientes recientemente descritos en otras series se han identificado algunos previamente diagnosticados de IDCV. Por el momento, para los 5 pacientes IDCV de nuestra cohorte que presentan una fosforilación basal aumentada no se han encontrado mutaciones en el gen *PIK3CD*.

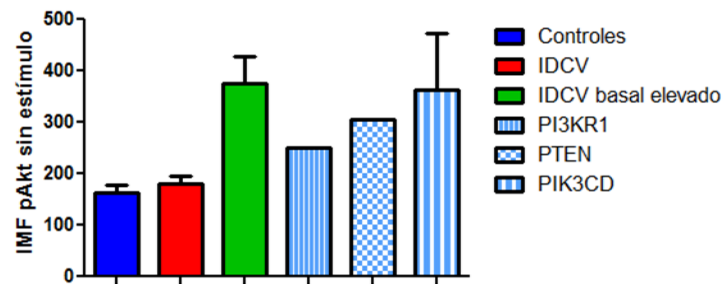


Figura 38 Fosforilación basal de Akt en linfocitos B totales (CD19⁺): comparación entre los niveles de fosforilación basal en controles, pacientes IDCV, pacientes IDCV con fosforilación basal incrementada y pacientes con mutaciones en *PI3KR1*, *PTEN* y *PIK3CD* respectivamente (IMF con media y EEM).

El estudio de fosforilación de la proteína S6 tras activación con anti IgM se ha realizado en 12 controles sanos y 17 pacientes IDCV. En la fosforilación de S6 (p S6) se observa una menor fosforilación de los linfocitos CD19⁺ de los pacientes con respecto a los controles. Habiendo diferencias significativas en la fosforilación de S6 en las células CD19⁺ (P-valor=0,0488), *Naive* (P-valor= 0,0268) y USm (P-valor= 0,0180) para el tiempo de estimulación con anti IgM más largo de 15 minutos de los pacientes IDCV con respecto a los controles sanos (Figura 39).

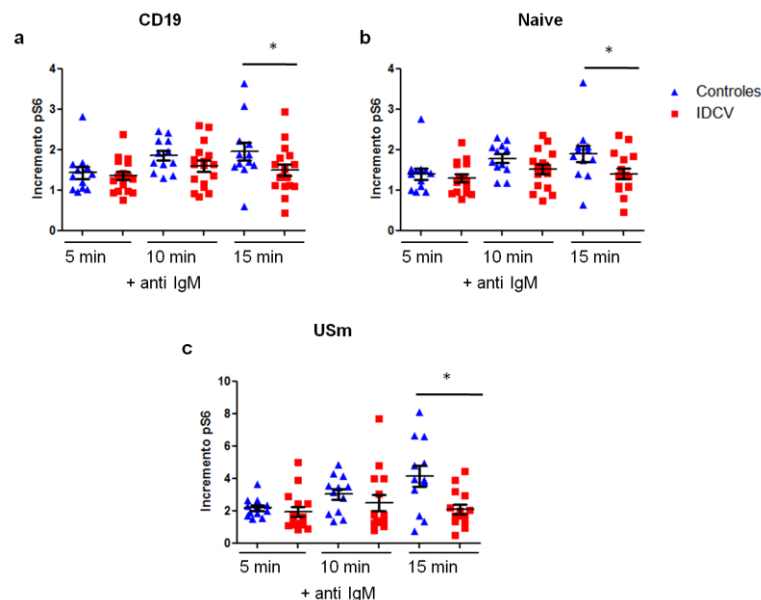


Figura 39: Incremento de los niveles de fosforilación de S6 a distintos tiempos de estimulación con anti IgM 5,10 y 15 minutos con respecto a la fosforilación basal de las muestras no estimuladas (Incremento IMF con media y EEM), **a** Fosforilación de S6 en células B totales CD19⁺; **b** fosforilación de S6 en células *Naive* y **c** fosforilación de S6 en células USm en controles y los pacientes IDCV. (* P-valor <0,05; test Mann-Whitney).

Para el análisis de la proteína S6 fosforilada también se subdividió el grupo de pacientes IDCV según las complicaciones clínicas de autoinmunidad (Figura 40) y linfoproliferación (Figura 41). Para los pacientes que presentan problemas autoinmunes en las células CD19⁺ se observan unos niveles de fosforilación de S6 ligeramente superiores con respecto al subgrupo de IDCV sin autoinmunidad, aunque no llegan a ser diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco con respecto a los controles sanos (Figura 40 a). Para la subpoblación *Naive* también se observa ligero incremento de la fosforilación de Akt en los pacientes con autoinmunidad, aunque tampoco llega a haber diferencias significativas entre pacientes con o sin autoinmunidad ni para controles. Sí que se observa que a los 15 minutos, el subgrupo de IDCV sin autoinmunidad tienen menos fosforilación de S6 que los controles (P-valor=0,0441) (Figura 40 b). Para las células USm los pacientes con autoinmunidad presentan una fosforilación mayor que el resto de IDCV sin dicha complicación a los 5 y 10 minutos, solo significativa a los 5 minutos (P-valor=0,0249). El grupo de IDCV sin autoinmunidad sigue presentando menos fosforilación que los controles a los 5, 10 y 15 minutos (P-valor=0,0102; P-valor=0,0089 y P-valor=0,0455 respectivamente).

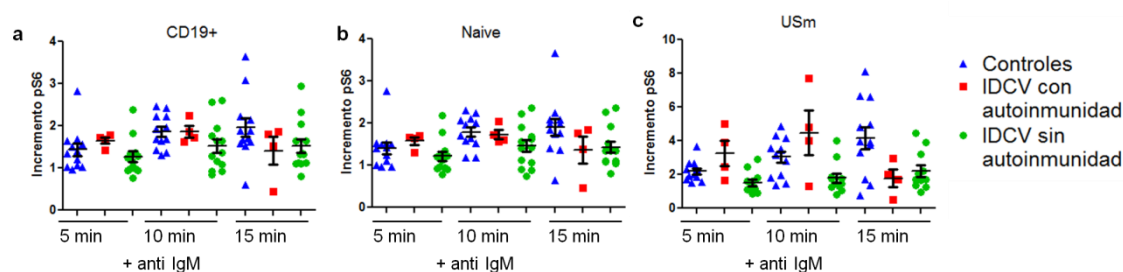


Figura 40: Niveles de fosforilación de S6 siguiendo cinética de activación con anti IgM a distintos tiempos en **a** linfocitos CD19⁺, **b** *Naive* y **c** USm, en controles sanos, pacientes IDCV y pacientes IDCV que presentan complicaciones autoinmunes (Incrementos IMF con media y EMM). No se indican la significación porque no se observan diferencias entre subgrupos IDCV; P-valor test Mann-Whitney referidos en el texto.

Los pacientes con linfoproliferación presentan un ligero aumento en los niveles de fosforilación de S6 con respecto al resto de pacientes sin dicha complicación en las células CD19⁺, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de pacientes IDCV. Y más bien parece que los pacientes IDCV con linfoproliferación llegan a los niveles de fosforilación de los controles sanos. El subgrupo de IDCV sin la complicación sigue presentando menos fosforilación con respecto a los controles a los 10 min de activación con anti IgM (P-valor=0,0441)

(Figura 41a). Para las células *Naive* es parecido a lo anterior, las células *Naive* de los pacientes en su conjunto expresan menos niveles de fosforilación de S6, pero el subgrupo de pacientes con linfoproliferación presenta niveles un poco superiores que el resto de pacientes sin dicha complicación, de nuevo debido al número de casos incluidos no llega a hacer significación estadística. Los pacientes sin linfoproliferación sí que tienen diferencias de fosforilación de S6 con respecto a los controles a los 5, 10 y 15 min respectivamente (P-valor=0,0398 y P-valor=0,0351; P-valor=0,0245) (Figura 41b). Algo muy similar ocurre para las células USm. Los pacientes con procesos linfoproliferativos presentan una fosforilación más parecida a los controles, y por tanto mayor que el resto de IDCV sin complicaciones linfoproliferativas, pero sin diferencias estadísticas entre ambos subgrupos de IDCV. Los pacientes sin linfoproliferación tienen menos fosforilación de S6 que los controles a los 5, 10 y 15 min respectivamente (P-valor=0,0098 y P-valor=0,0131; P-valor=0,0252) (Figura 41c).

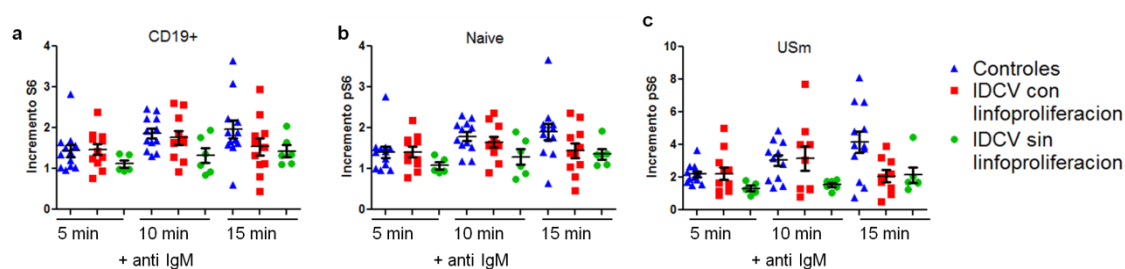


Figura 41: Niveles de fosforilación de S6 siguiendo cinética de activación con anti IgM a distintos tiempos en **a** linfocitos CD19+, **b** *Naive* y **c** USm, en controles sanos, pacientes IDCV con complicaciones de tipo linfoproliferativa y pacientes IDCV sin dicha complicación (Incrementos IMF con media y EMM); P-valor test Mann-Whitney referidos en el texto.

Bloque experimental II: Análisis de la expresión de microARNs en linfocitos B

Microrray de expresión de microARNs

Como primera aproximación para el estudio de la expresión de microARNs en linfocitos B de pacientes diagnosticados de IDCV, se realizó un microarray de expresión de microARN en la Unidad de Genómica del CNIC. Para dicho estudio se incluyeron 13 pacientes y 3 controles sanos. Del microarray se obtuvieron un total de 397 microARNs que cumplieran con los requisitos para el análisis. Se preseleccionaron los microARNs para validar por Q-PCR siguiendo los criterios explicados en materiales y métodos (Figura 42).

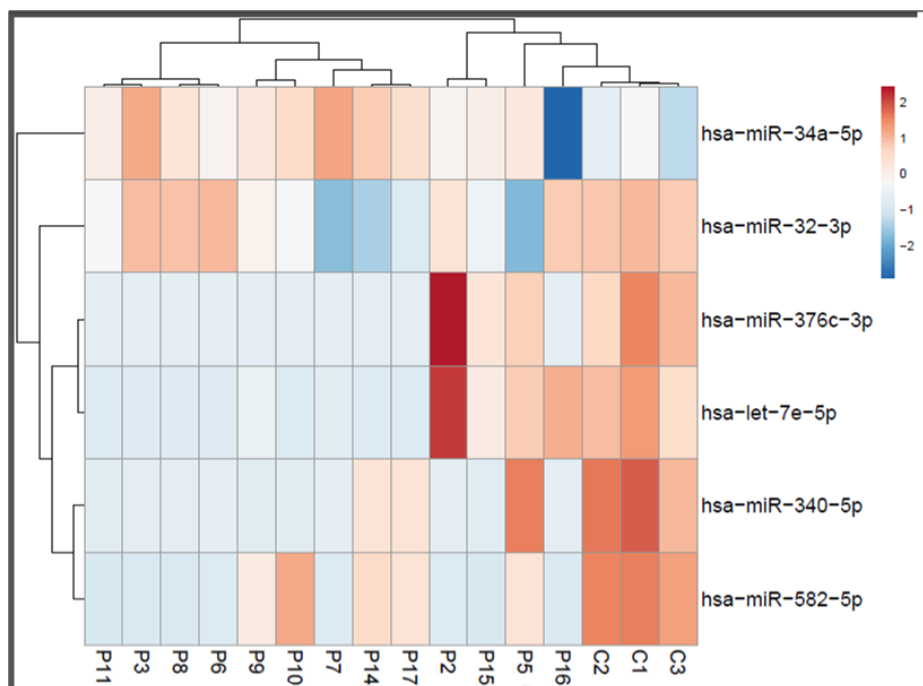


Figura 42: Representación de la expresión de los microARNs preseleccionados para su posterior validación por Q-PCR, pacientes IDCV (P) y controles (C). Según la escala de colores azules menor expresión y rojo mayor expresión.

Los microARN (miR) hsa-miR-582ap-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-376c-3p, hsa-let-7e-5p y hsa-miR-32-3p, se expresan a niveles más bajos en el conjunto de todos los pacientes IDCV con respecto a los controles. Sólo el hsa-miR-34a-5p mostraba mayor expresión en la mayoría de los pacientes con respecto a los controles (Figura 43 a).

Intentamos definir si alguno de los microARNs presentaba expresión diferencial atendiendo a las características que presenten de fenotipo B, de tal manera que se establecieron 4 subgrupos previamente definidos en la literatura (Euroclass Trial). Todos los pacientes tenían >1% de linfocitos B totales. El grupo 1 lo definimos con pacientes IDCV con reducción de linfocitos Sm (<2% Sm) y expansión de células transicionales (>9%). El grupo 2 caracterizado por presentan menos del 2% de células Sm acompañado de expansión de células CD21 *low* (>10% del total de linfocitos B). Los pacientes de los grupos 3 y 4 se caracterizan por tener un mayor número de linfocitos Sm que los grupos anteriores (>2% Sm), en el caso del grupo 3 sin expansión de células CD21 *low* y en el grupo 4 los pacientes sí que presentan expansión de esta subpoblación CD21*low* (>10%). No se observan diferencias relevantes entre los subgrupos de pacientes a pesar de tener fenotipos B distintos (Figura 43 b).

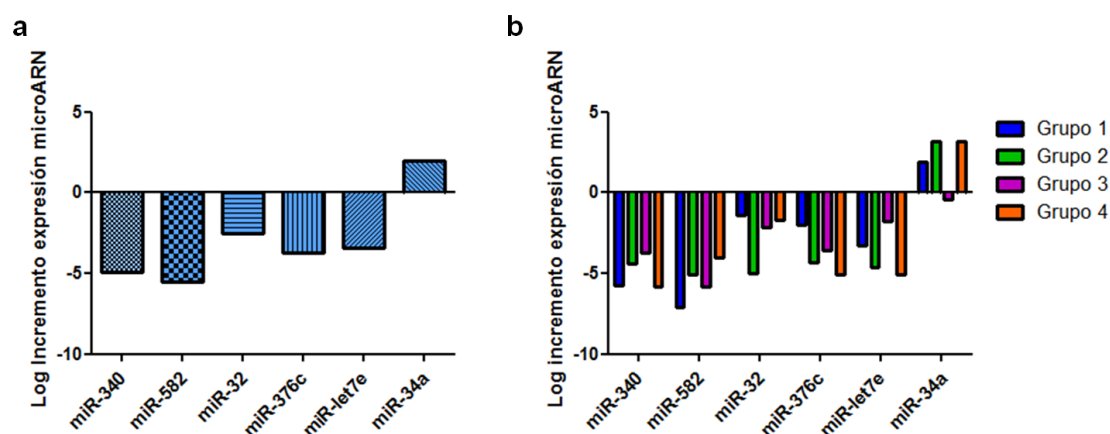


Figura 43: Representación logarítmica del incremento de expresión de los microARNs en el microarray con respecto al grupo control; **a** conjunto de todos los pacientes IDCV; **b** Pacientes IDCV subdivididos por subgrupos atendiendo al fenotipo B.

Validación de microARN seleccionados por Q-PCR

Para la validación de microARNs se realizó una Q-PCR con muestras de células CD19⁺ de pacientes y controles. Se volvieron a recoger muestras de 14 pacientes y 11 controles sanos. La pureza de células CD20⁺ aisladas de todas las muestras de pacientes y controles era mayor del 95%.

La validación por Q-PCR del miR-582 no muestra diferencias entre pacientes IDCV y controles (Figura 44 a), aunque en el array mostraba una expresión más baja que los controles. La expresión relativa del miR-340 (Figura 44 b), no difiere entre

pacientes y controles. Aunque sí que aparecen dos grupos de pacientes unos con baja expresión para este microARN (menor que los controles en el mismo sentido de los resultados del array) y otros 3 pacientes IDCV con expresión más alta. Estos 3 pacientes presentan todos reducción de células Sm, pero sin embargo no hay otro parámetro de fenotipo B o clínico estudiado que pueda relacionarlos.

Los miR-376 y miR-let 7e en el array presentaban una tendencia de menor expresión en general en los pacientes con respecto a los controles. La validación por Q-PCR no muestra que existan diferencias entre las nuevas muestras recogidas de pacientes y controles para ninguno de estos dos microARNs (Figura 44 c y d). Cabe destacar que en el caso de miR-let 7e los pacientes que presentan una mayor expresión pertenecen al grupo 1 (con expansión de células transicionales). La expresión relativa de miR-32 analizada por Q-PCR tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, aunque sí que se diferencian dos subgrupos de pacientes IDCV (Figura 44 e).

El miR-34a en el array mostraba una mayor expresión generalizada en todo el conjunto de pacientes con IDCV (Figura 44 f). Ha sido el único microARN de entre los elegidos para validar que se ha confirmado una mayor expresión y es estadísticamente significativa la diferencia entre pacientes con IDCV y controles (P-valor=0,0350).

Quisimos investigar su posible implicación y mayor expresión en el contexto del linfocito B. En la literatura encontramos que dos de sus posibles dianas son Bcl-2 y Foxp1. Bcl-2 como ya se ha mencionado en el Bloque I de Resultados en una proteína antiapoptótica, mientras que Foxp1 es un factor transcripcional que se expresa en células humanas del CG y pre-CG, se encarga entre otras funciones, de disminuir la expresión de genes proapoptóticos y también tiene una función fundamental durante la diferenciación en los primeros estadios en médula ósea.

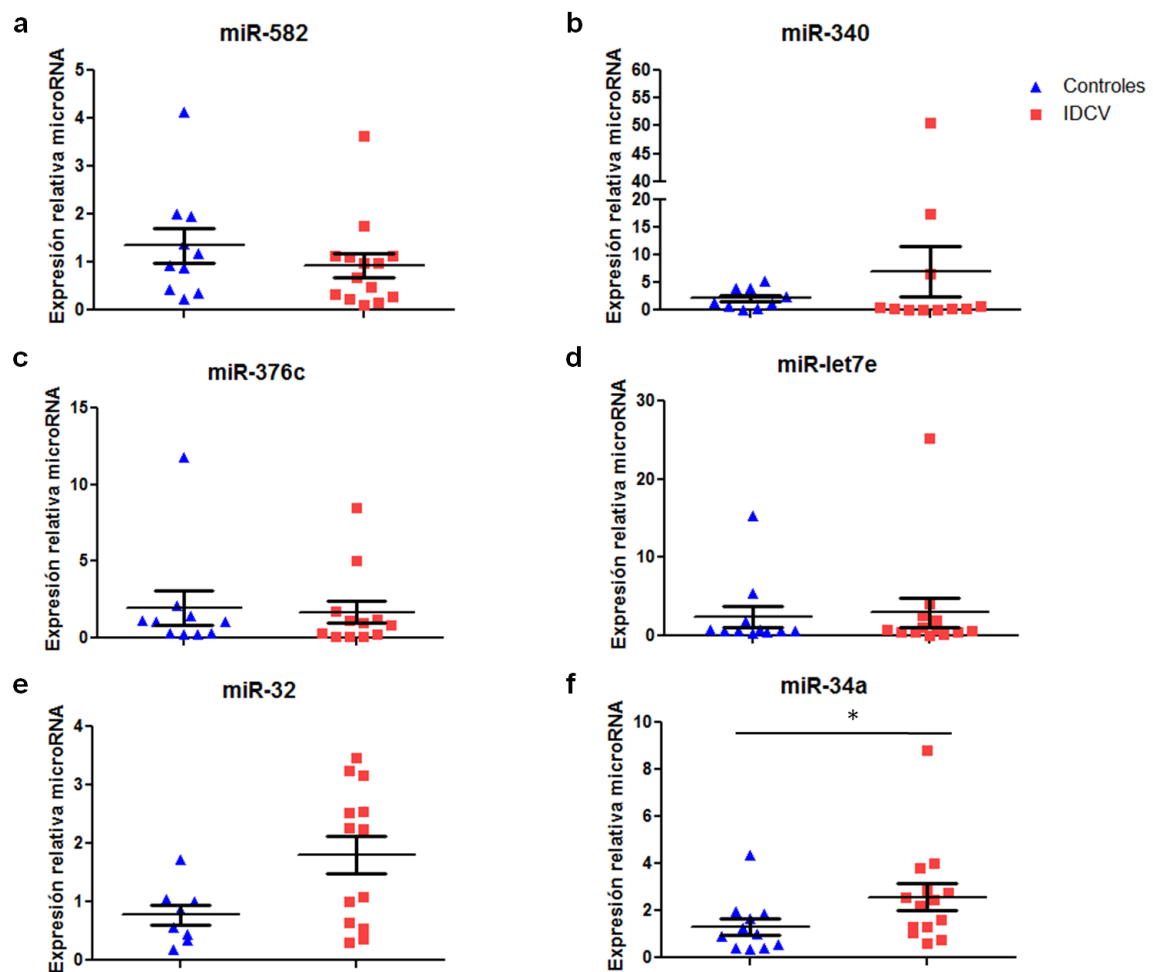


Figura 44: Expresión relativa de los microARNs seleccionados para validar por Q-PCR, **a** miR-582, **b** miR-340 **c** miR-376c, **d** miR-let7e, **e** miR-32 y **f** miR-34a, en controles sanos y pacientes IDCV (media y EEM) (* P-valor <0,05, test Mann-Whitney).

En la base de datos miRBASE se describe la familia de microARN-34 que da lugar a tres tipos de microARNs maduros, uno de ellos es el 34a que forma parte de la red o *network* del supresor tumoral p53. En esta misma base de datos se puede acceder a las múltiples dianas validadas en MIRTARBASE, entre ellas se encuentran, como ya se ha mencionado, Bcl-2 y Foxp1. Para ambas dianas hay una evidencia clara de la regulación de miR-34a validada tanto por ensayos con reporteros, por *western blot* y Q-PCR en el caso de Bcl-2, y la evidencia de la regulación de Foxp1 por el miR-34a también está validada por estudios ensayos con reporteros y *western blot*.

Análisis de la expresión de las dianas de miR-34a

Con las muestras de ARN de linfocitos B aisladas de 14 pacientes con IDCV y 9 controles utilizadas para validar la expresión de los microARNs por Q-PCR, se realizó una nueva Q-PCR para dos de las dianas del miR-34a: Bcl-2 y Foxp1. No se observan diferencias en la expresión de estos ARNm en linfocitos B de pacientes IDCV y controles (Figura 45).

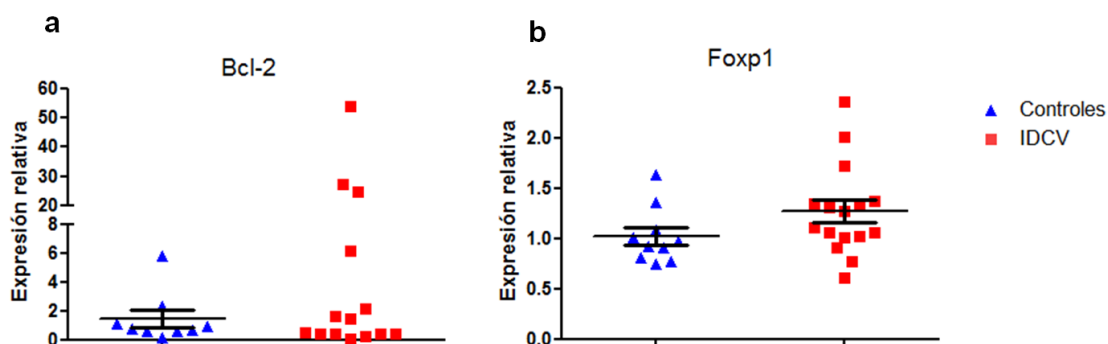


Figura 45: a Expresión relativa de los ARNm Bcl-2 y b Foxp1 en células CD19⁺ (media y EEM).

Finalmente como existían los datos de la proteína Bcl-2 en células CD19⁺ totales así como en las subpoblaciones B *Naive*, USm y Sm (Bloque I de Resultados). Se relaciona la expresión relativa del miR-34a y los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 en células B totales de pacientes con IDCV (Figura 46). Las muestras de linfocitos B totales aislados para la expresión del miR-34a por Q-PCR y los datos de citometría de flujo de la expresión de Bcl-2 se realizaron en la mayoría de los pacientes IDCV con muestras obtenidas en días distintos, no pudiendo obtener las mismas muestras de los controles sanos. Se comprueba la correlación entre miR-34a y los datos de su diana la proteína antiapoptótica Bcl-2, la correlación es negativa y estadísticamente significativa. Con un coeficiente de Spearman $R = -0,6294$ y $P\text{-valor} = 0,0283$. El aumento por tanto de miRNA-34a produce la disminución de la expresión de la proteína Bcl-2 expresado como IMF (Figura 46).

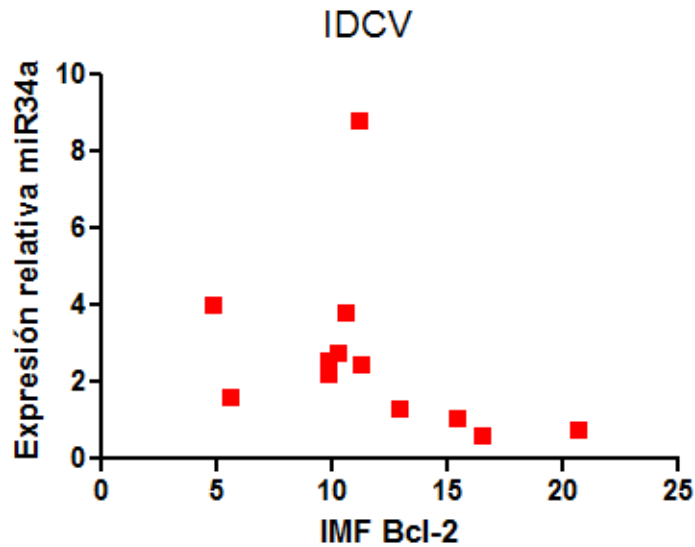


Figura 46: Relación entre la expresión relativa del miR-34a (Q-PCR) y su diana la proteína Bcl-2, cuantificada por citometría de flujo y expresada como IMF en células CD19⁺ en pacientes IDCV.

Expresión del miR-34a y sus dianas en células *Naive* activadas con CD40L e IL-21

A partir de las muestras de pacientes y controles que se obtuvieron para los estudios de activación *in vitro* de células *Naive* con CD40L e IL-21 (Bloque I de Resultados), se analizó la expresión del miR-34a en 12 pacientes y 7 controles.

Las células *Naive* basales (sin activar) de los pacientes con IDCV expresan más miR-34a con respecto a los controles sanos (P-valor=0,0114) (Figura 47). La estimulación *in vitro* apenas afecta a la expresión del miR-34a ni en pacientes ni en controles. El incremento de expresión del miR-34a de las células activadas con respecto a las no activadas muestra un mayor incremento en los controles que los pacientes (Figura 48). Esto es debido a los niveles tan altos que presentan las células *Naive* sin estímulo.

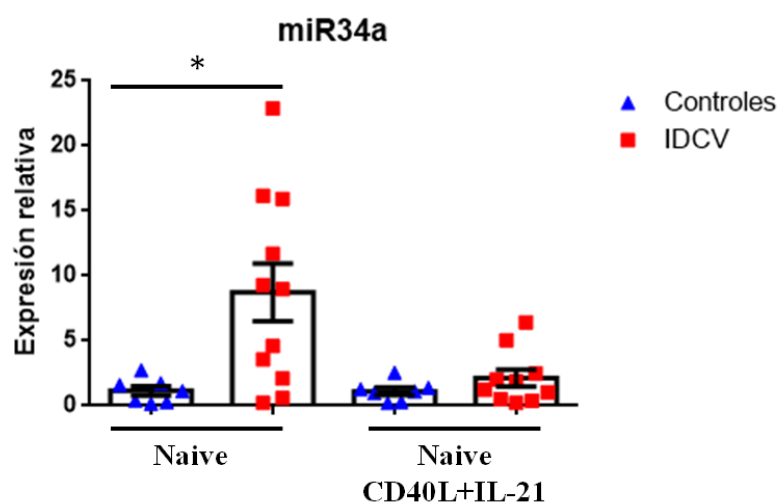


Figura 47: Expresión relativa del miR-34a en pacientes IDCV y controles en células *Naive* no estimuladas mantenidas 4 días en cultivo *in vitro* y en células *Naive* estimuladas con CD40L e IL-21 *in vitro* durante 4 días. Las cajas representan la media y EEM del conjunto de datos (* P-valor <0,05; test Mann-Whitney).

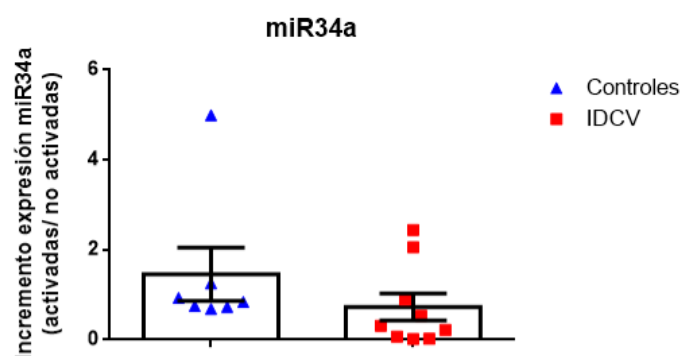


Figura 48: Incremento de la expresión relativa de miR-34a en controles y pacientes IDCV de las muestras activadas con CD40L e IL-21 respecto a las mismas muestras no activadas. Las cajas representan la media con EEM.

Así mismo, se analizó la expresión relativa de los ARNm diana de miR-34a: Bcl-2 y Foxp1 en las muestras de controles y pacientes de células *Naive* sin activar y células *Naive* estimuladas con CD40L e IL-21 (Figura 49).

Existe correlación negativa (estadísticamente significativa) para las células *Naive* sin activar de los pacientes, entre miR-34a y Bcl-2. Tras activación los niveles de miR-34a aumentan de forma muy discreta por lo que apenas están afectando a los niveles de Bcl-2 cuyo ligero incremento se debería a la propia activación (Figura 50 y

Tabla 6). Para los controles no existe ningún tipo de correlación entre la expresión de miR-34a y Bcl-2 en células *Naive* y células *Naive* activadas con CD40L+IL-21. No se observa ningún tipo de correlación entre la expresión relativa de miR-34a y los niveles de expresión del ARNm de Foxp1 en linfocitos B *Naive* en estado basal ni para linfocitos B *Naive* activados ni en pacientes ni controles (Figura 51 y Tabla 7).

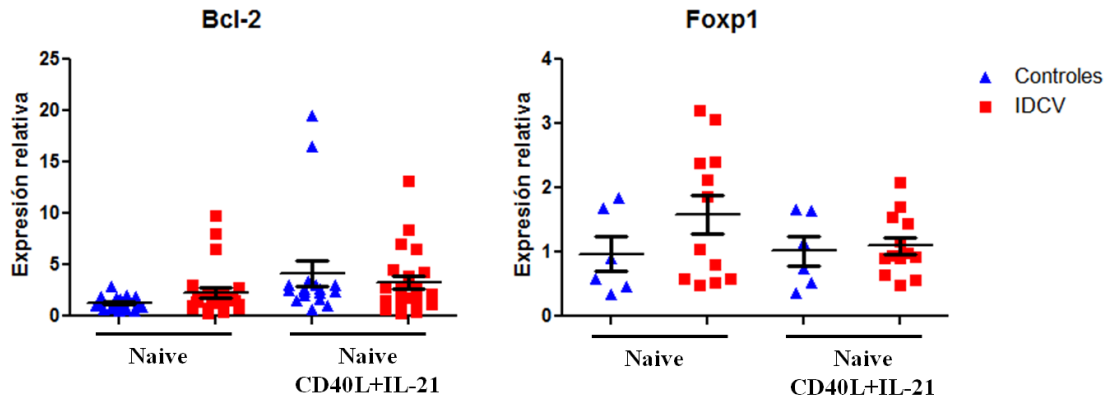


Figura 49: Expresión relativa de las dianas de miR-34a, Bcl-2 y Foxp1 en células *Naive* mantenidas en cultivo *in vitro* sin estímulos y *Naive* activadas con CD40L e IL-21 durante 4 días (media y EEM).

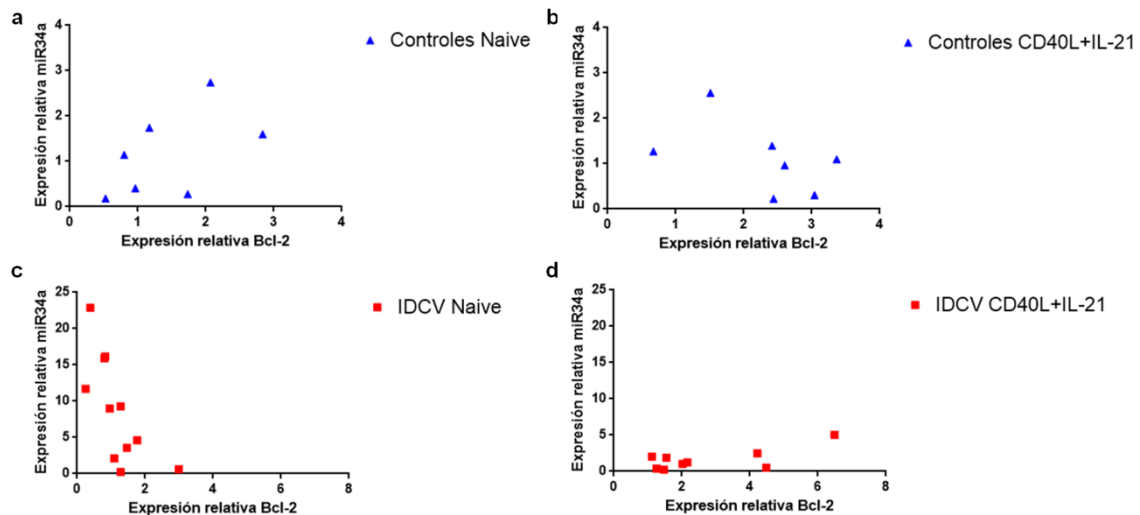


Figura 50: a y c correlación expresión relativa de miR-34a y su diana Bcl-2 en controles y pacientes con IDCV en células *Naive* sin activar, b y d células *Naive* activadas durante 4 días con CD40L+IL-21. Los correspondientes coeficientes de correlación y P-valor se detallan en (Tabla 6).

Tabla 6: Coeficientes de correlación de Spearman y P-valor de las correlaciones entre la expresión relativa de miR34a y la expresión relativa de su diana Bcl-2 en células *Naive* y células *Naive* activadas (CD40L+IL-21) en controles y pacientes con IDCV.

Correlación expresión relativa/ muestra	Coefficiente Spearman R	P-valor
<i>Naive</i> miR34a y Bcl-2 Controles	0,6071	0,1667
<i>Naive</i> (CD40L+IL-21) miR34a y Bcl-2 Controles	-0,5714	0,2000
<i>Naive</i> miR34a y Bcl-2 IDCV	-0,7818	0,0064**
<i>Naive</i> (CD40L+IL-21) miR34a y Bcl-2 IDCV	0,300	0,3713

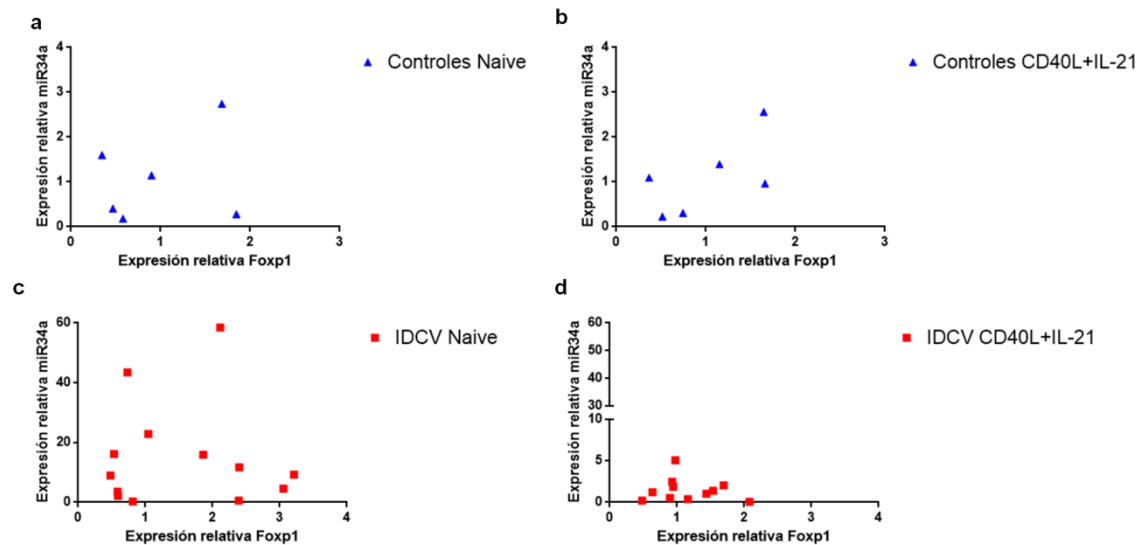


Figura 51: a y c correlación expresión relativa de miR-34a y su diana Foxp1 en controles y pacientes en células *Naive* sin activar, b y d células *Naive* activadas durante 4 días con CD40L+IL-21. Los correspondientes coeficientes de correlación y P-valor se detallan en (Tabla 7).

Tabla 7: Coeficientes de correlación de Spearman y P-valor de las correlaciones entre la expresión relativa de miR34a y la expresión relativa de su diana Foxp1 en células *Naive* y células *Naive* activadas (CD40L+IL-21) en controles y pacientes con IDCV.

Correlación expresión relativa/ muestra	Coefficiente Spearman R	P-valor
<i>Naive</i> miR34a y Foxp1 Controles	-0,085	0,9194
<i>Naive</i> (CD40L+IL-21) miR34a y Foxp1 Controles	0,371	0,4972
<i>Naive</i> miR34a y Foxp1 IDCV	0,027	0,9462
<i>Naive</i> (CD40L+IL-21) miR34a y Foxp1 IDCV	0,009	0,9895

Bloque experimental III: Análisis perfil de metilación del ADN en linfocitos B

En un estudio previo partiendo de una pareja de gemelos monozigóticos discordantes para la IDCV ¹²³, se analizaron más de 450.000 CpGs en linfocitos B totales (CD19⁺) en colaboración con el Dr. Ballestar. Realizamos el estudio de los genes en los que se encontraban las 311 CpG con diferente metilación entre los hermanos. Elegimos algunas de ellas en genes relevantes asociados a la biología de los linfocitos B. Para validar los resultados aislamos muestras de 16 pacientes con IDCV y 12 controles recogidas en el Hospital La Paz. Realizamos la separación por *sorting* (tal y como se ha descrito en Materiales y métodos) de las subpoblaciones B *Naive*, USm y Sm, posteriormente nuestros colaboradores analizaron el estado de metilación de las CpG seleccionadas por pirosecuenciación con bisulfito. Los resultados mostraron que en controles sanos había una pérdida progresiva de metilación en la transición de linfocitos B *Naive* a linfocitos Sm en las CpG seleccionadas de los genes *TCF3*, *PI3KCD*, *KCNN4*, *KCNC4*, *BCL2L1*, *RPS6KB2* y *CORO1B*. Sin embargo, en los pacientes con IDCV aunque presentan unos niveles de metilación muy parecidos a los controles en los linfocitos B *Naive*, presentan un defecto en la desmetilación hacia la transición de linfocitos B de memoria, siendo especialmente elevados los niveles de metilación en las células Sm.

Este fue nuestro primer estudio que demostró alteraciones epigenéticas en la IDCV, se describió la incapacidad de los pacientes con IDCV de desmetilar algunos genes en la transición de células *Naive* a células Sm, probablemente influenciados por el ambiente que da lugar al debut de la IDCV, o bien que otras causas provoquen el desarrollo de la IDCV y las alteraciones que observamos en la desmetilación del ADN sean manifestaciones de una función deficiente de los linfocitos B.

Para continuar con esta línea de investigación, se ha decidido una nueva estrategia, a partir de los datos recientemente publicados por Kulis *et al* ¹¹⁶ que han realizado un análisis del metiloma en distintas subpoblaciones de la diferenciación B confirmando que suceden cambios importantes en el estado de metilación de las CpGs localizadas en regiones promotoras de diversos genes en diferentes subpoblaciones B.

Selección de genes candidatos

Realizamos un listado de genes candidatos relevantes para la biología del linfocito B. Con los datos disponibles de Kulis *et al* de niveles de metilación en CpGs de linfocitos B *Naive* y de linfocitos de memoria analizados en esos genes, se eligieron las CpG siguiendo los criterios descritos en la sección de Materiales y métodos.

Así mismo se realiza una representación gráfica de las CpG de cada gen para localizar sus posiciones relativas con respecto al gen, para ello se usa la base de datos *UCSC Genome Browser* (GRCh 37/hg 19). Para la representación gráfica de cada CpG se utiliza el log2 Ratio (media de metilación de los linfocitos B de memoria vs. media de metilación de los linfocitos B *Naive*) (Figura 52). Log2 Ratio menor de 0 refleja hipometilación desde los linfocitos B *Naive* a los linfocitos de memoria; mientras que Log2 Ratio mayor de 0 refleja la hipermetilación en dicha transición.

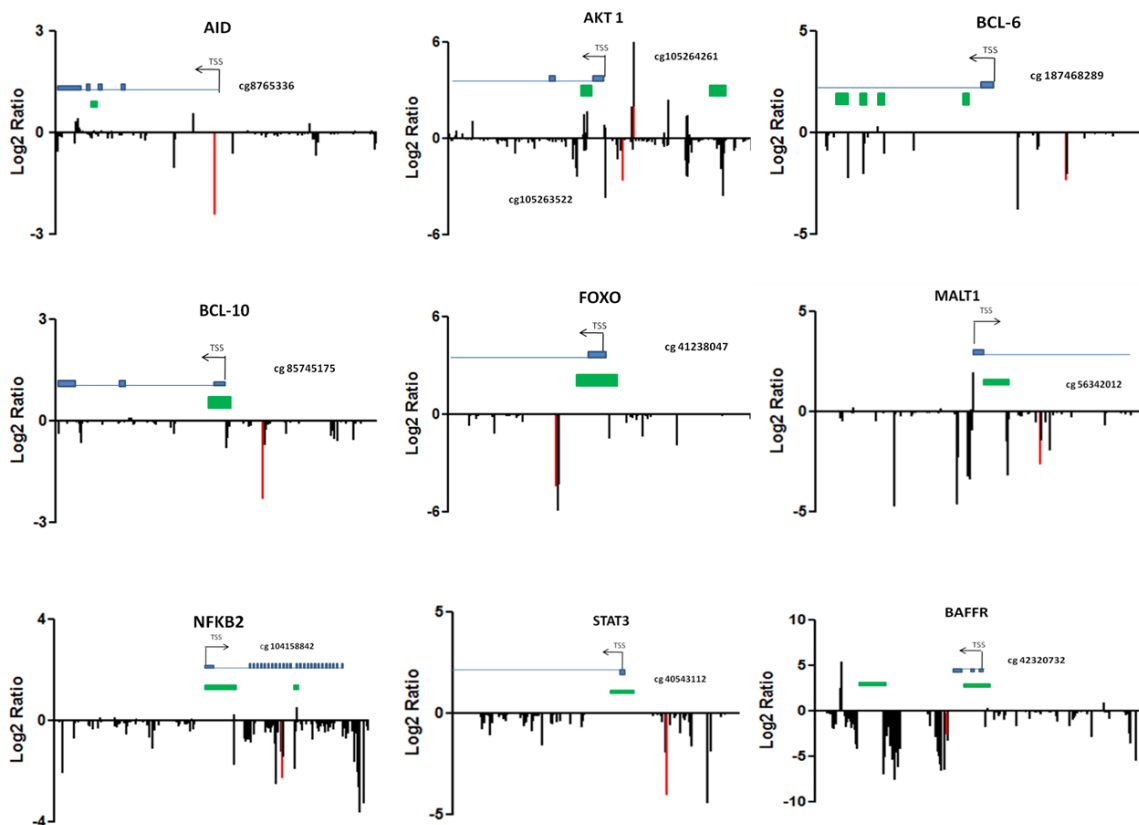


Figura 52: Representación de los datos de CpGs disponibles (en negro) con la CpG seleccionada para el análisis (en rojo) en diferentes genes. Se indica el sitio y la dirección de inicio de la transcripción (TSS) de cada gen, los exones representados como cajas azules y las islas CpG marcadas como cajas verdes. Log2 Ratio < 0 indica hipometilación desde la transición de linfocitos B *Naive* a linfocitos B de memoria; Log2 Ratio \geq 0 indica hipermetilación desde B *Naive* a B de memoria.

Finalmente se seleccionaron 10 CpGs en 9 genes diferentes. En 9 de las 10 CpG seleccionadas hay hipometilación en la transición de linfocitos B *Naive* a linfocitos B de memoria, excepto para el gen *AKT1* se escogieron dos CpG una con hipometilación en la transición *Naive*- memoria y otra con hipermetilación en dicha transición (Tabla 8).

Las CpGs seleccionadas se encuentran en distintos genes: *BAFFR* implicado en la supervivencia del linfocito B, de la vía de activación de PI3K se seleccionaron CpGs relevantes en *AKT* y *FOXO*. En las moléculas de señalización *BCL-10* y *MALT1* que conllevan a la activación de la vía canónica de NFκB, en *NFκB2* que es un componente de la vía de activación alternativa de NFκB y en *STAT3* que media la señalización por receptores de citoquinas. De la reacción del CG se han escogido *BCL-6*, componente principal que inicia la formación del CG y *AID* fundamental para los procesos de CSR y SHM en el CG (Figura 53).

Tabla 8: CpGs seleccionadas para el análisis de la metilación del ADN por pirosecuenciación con bisulfito. Se indica el gen, la localización cromosómica y la localización de cada CpG. Del artículo de Kulis et al, obtuvimos la media de metilación de cada CpG en linfocitos B *Naive* y B de memoria. Realizamos la Diferencia de metilación (Media *Naive*- Media Memoria) y el Ratio (Media Memoria / Media *Naive*).

Gen	Chr	MAPINFO	Media (% metilación ADN) Linfocitos <i>Naive</i>	Media (% metilación ADN) Linfocitos Memoria	Diferencia (Media <i>Naive</i> - Media Memoria)	Ratio (Media Memoria/ Media <i>Naive</i>)
<i>AID</i>	chr12	8765336	0.8770545	0.16275055	0.71430395	0.18556492
<i>AKT1</i>	chr14	105263522	0.72462	0.11752735	0.60709265	0.1621917
<i>AKT1</i>	chr14	105264261	0.0921737	0.3631635	-0.2709898	3.93999047
<i>BCL10</i>	chr1	85745175	0.875305	0.1778385	0.6974665	0.20317318
<i>FOXO1</i>	chr13	41238047	0.6171275	0.02840715	0.58872035	0.04603125
<i>MALT1</i>	chr18	56342012	0.848091	0.1348035	0.7132875	0.15894933
<i>NFκB2</i>	chr10	104158842	0.829262	0.173367	0.655895	0.20906179
<i>STAT3</i>	chr17	40543112	0.8718725	0.0526339	0.8192386	0.0603688
<i>BAFFR</i>	chr22	42320732	0.894724	0.1377905	0.7569335	0.15400336
<i>BCL6</i>	chr3	187468289	0.604177	0.1189405	0.4852365	0.19686367

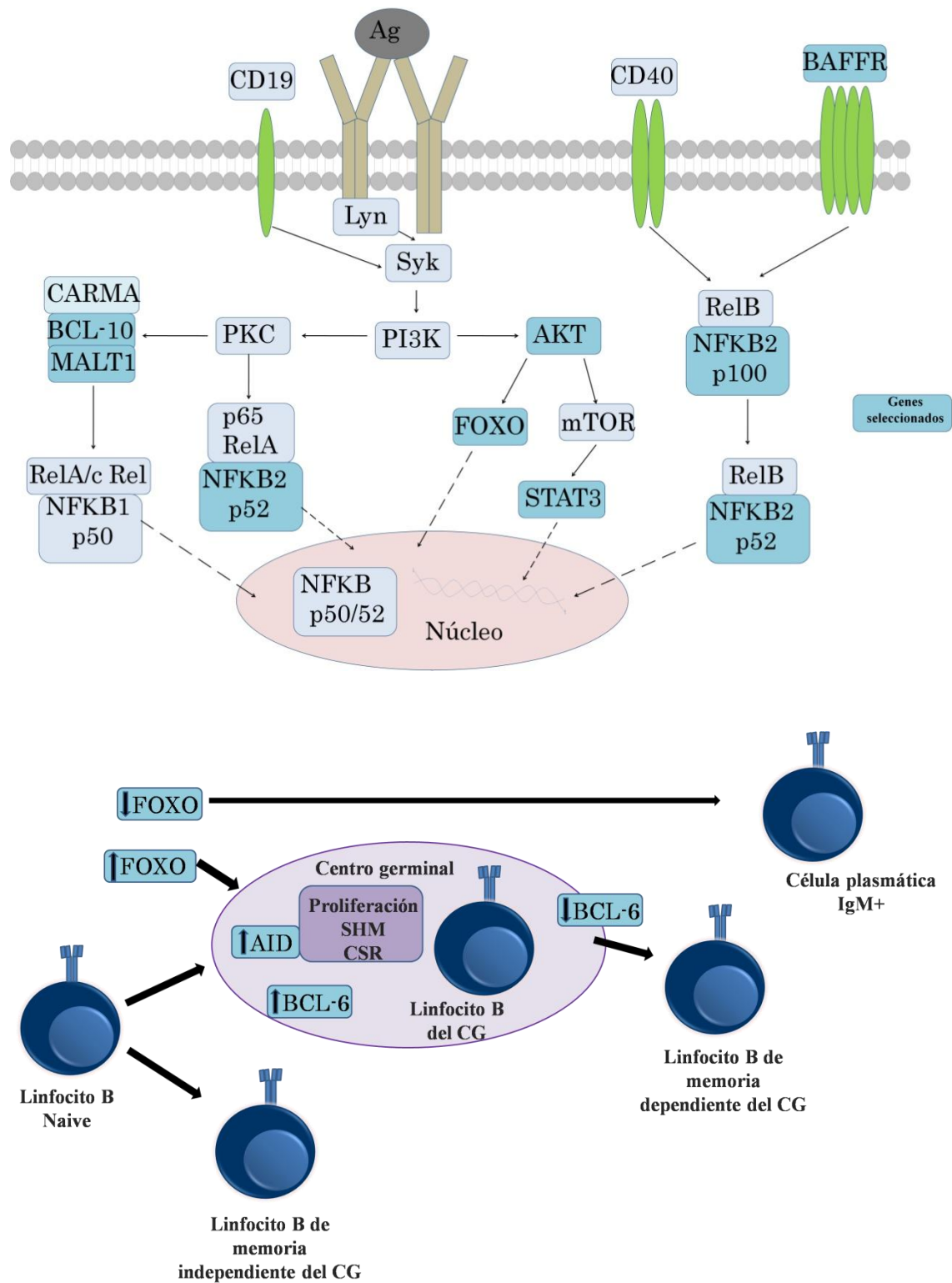


Figura 53: Genes seleccionados (en azul) implicado en la supervivencia del linfocito B (*BAFFR*), la vía de activación de PI3K (*AKT* y *FOXO*), la vía canónica de NFκB (*BCL-10* y *MALT1*), la vía de activación alternativa de NFκB (*NFκB2*), la señalización por receptores de citoquinas mediado por JAK/ STAT (*STAT3*), el regulador de la reacción del CG (*BCL-6*) y *AID* fundamental para los procesos de CSR y SHM en el CG.

Análisis del estado de metilación en las subpoblaciones B

Para explorar la potencial alteración de la metilación como mecanismo implicado en la desregulación de los linfocitos B de memoria en pacientes con IDCV, comparamos los niveles de metilación de las 10 CpG seleccionadas en 9 genes en las fracciones aisladas por *sorting* de linfocitos B *Naive* (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻), USm CD19⁺ IgD⁺ CD27⁺) y Sm (CD19⁺ IgD⁻ CD27⁺) de un total de 22 pacientes con IDCV y 16 controles sanos (Figura 54).

En primer lugar, nuestra cohorte de controles sanos se comportan como los datos obtenidos de *Nature Genetics* Kulis et al ¹¹⁶. Todas las CpG presentan altos niveles de metilación en las células B *Naive*, con una desmetilación en la transición hacia linfocitos B de memoria en los controles sanos. La desmetilación también es evidente en las células B USm, una subpoblación no estudiada por Kulis et al, que representan un estadio intermedio entre las células *Naive* y las células Sm. Los resultados indican que la desmetilación en CpGs clave debe ser relevante para la generación y el mantenimiento de células B de memoria.

Los linfocitos B *Naive* de los pacientes presentan niveles similares de metilación a los controles sanos, excepto para una CpG. La CpG seleccionada en *FOXO* presenta niveles de metilación disminuidos en las células *Naive* de los pacientes con respecto a los controles sanos (P-valor=0,0006) (Figura 54c).

Cuando se analiza el estado de metilación de las 10 CpGs seleccionadas en las células B de memoria de los pacientes IDCV se detectan 3 patrones diferentes al comparar con los controles sanos. Se observa que la alteración en la desmetilación previamente encontrada en las células Sm de pacientes IDCV, no es global, si no que más bien parece específica de ciertos genes. En efecto, no observamos diferencias de metilación entre pacientes IDCV y controles en las CpG estudiadas de *BCL-10* y *BAFFR*, para ninguna de las subpoblaciones B analizadas (*Naive*, USm y Sm) (Figura 54 h; i). La única CpG seleccionada con una tendencia diferente al resto, con hipermetilación en la transición desde células *Naive* a células B de memoria, en el gen *AKT1*, no muestra diferencias en los linfocitos B de los pacientes IDCV con respecto a los controles (Figura 54 j).

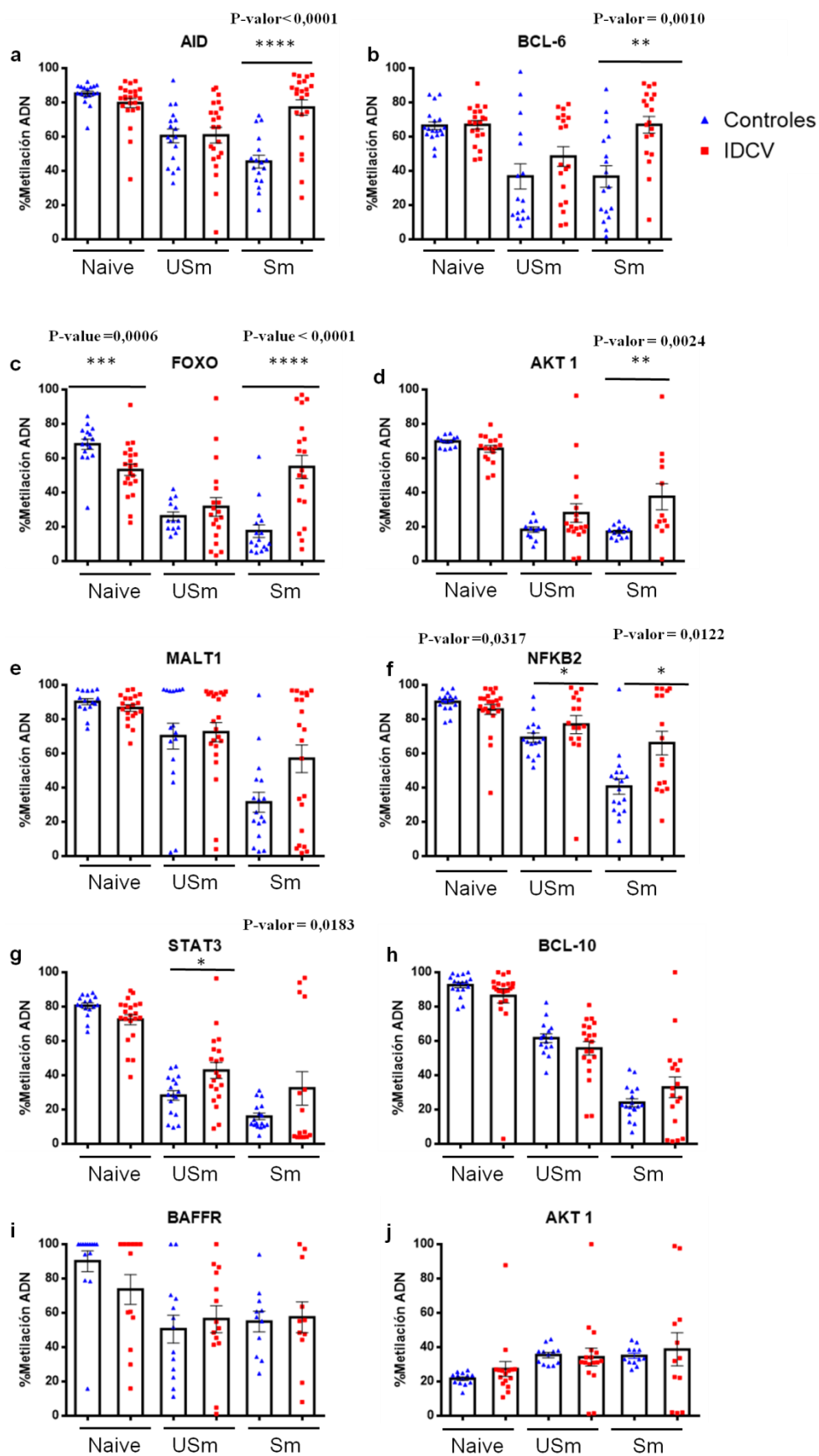


Figura 54: Metilación del ADN en las CpG seleccionadas en diferentes genes, en células *Naive*, USm y Sm de controles y pacientes IDCv. Las cajas representan la media con EEM (P-valor test Mann-Whitney)

Sin embargo, para el resto de CpGs observamos una desmetilación aberrante en los estadios finales de diferenciación a células Sm. En el caso de *AID* los pacientes IDCV presentan una hipermetilación en las células Sm comparado con los controles sanos (P-valor <0,0001) (Figura 54 a).

Para la CpG seleccionada en el gen *BCL-6*, las células B *Naive* de los controles y los pacientes presentan niveles de metilación parecidos, los controles presentan una desmetilación de la CpG estudiada en las células USm y las células Sm. Sin embargo, las células Sm de los pacientes IDCV presentan en niveles de metilación elevados de forma significativa con respecto a los controles (P-valor=0,0010) (Figura 54 b).

En la CpG analizada correspondiente al gen *FOXO*, aunque los pacientes IDCV presentan hipometilación en las células *Naive*, las células Sm de los pacientes presentan niveles de metilación mayores que los controles para esta misma CpG analizada en *FOXO* (P-valor <0,0001) (Figura 54 c).

En el gen *AKT1* la CpG que muestra un patrón de desmetilación en controles desde las células *Naive* a las células Sm, de nuevo las células Sm de los pacientes muestran unos niveles de metilación mayor que los controles (P-valor =0,0024) (Figura 54 d). Para la CpG seleccionada del gen *STAT3* algunos pacientes presentan en las células *Naive* menos metilación que los controles. Sin embargo, en las células USm aumentan los niveles de metilación de *STAT3*, siendo incluso más altos que los controles (P-valor= 0,0183) (Figura 54 g). Las células Sm de los pacientes presentan dispersión en los niveles de metilación, con un subgrupo de pacientes con niveles de metilación elevados y otro subgrupo de pacientes con niveles más similares a los controles sanos. En la transición desde células B *Naive* a células B de memoria los pacientes muestran la incapacidad para desmetilar como los controles sanos la CpG del gen *NFKB2*, en concreto, tanto las células USm como las células Sm de los pacientes tienen más metilación (P-valor= 0,0317, P-valor= 0,0272 respectivamente) con respecto a los controles (Figura 54 f). En el gen *MALT1* la CpG seleccionada presenta niveles de metilación parecidos en células *Naive* y células USm de pacientes y controles. En las células Sm hay un grupo de pacientes que presentan niveles de metilación mayores que los controles, aunque la diferencia entre pacientes y controles no llega a ser estadísticamente significativa (Figura 54 e).

Perfil de metilación en los pacientes IDCV relacionado con el fenotipo B

Después quisimos analizar si los niveles de hipermetilación presentes en algunas CpGs en genes relevantes para la biología del linfocito B podían tener relación con la disminución de subpoblaciones B de memoria observada en algunos pacientes con IDCV.

Para ello, se han analizado los niveles de metilación de ADN en combinación con el fenotipo B que muestren los pacientes, según los rangos de normalidad establecidos en el *Euroclass Trial*¹²⁶ (Tabla 4). Tal y como se ha descrito al principio de los resultados de la cohorte, muchos de los pacientes incluidos en este estudio presentan reducidas las subpoblaciones B de memoria.

Comparamos aquellos pacientes con fenotipo B normal (color rojo Figura 55), pacientes con porcentajes reducidos de linfocitos Sm pero linfocitos USm normales (color naranja Figura 55) y otro subgrupo con ambas subpoblaciones de memoria reducidas (color verde Figura 55), para las CpG en las que hemos observado previamente diferencias significativas de metilación entre el grupo total de pacientes IDCV y controles (Figura 54).

En general, aunque solo hay 2 pacientes con distribución de subpoblaciones B normal (color rojo en la Figura 55), presentan unos porcentajes de metilación parecidos a los controles sanos y tienden a desmetilar en la subpoblación de células Sm como los controles sanos (Figura 55). Lo que implica que la hipermetilación puede estar contribuyendo a la reducción de células B de memoria en pacientes con IDCV. Sin embargo, hay una excepción para la CpG analizada en el gen *BCL-6*, los pacientes con fenotipo normal siguen presentando valores de metilación muy altos en las células Sm (Figura 55 b), esta hipermetilación puede estar asociada con estadios más tardíos de diferenciación, tal y como se ha descrito en los pacientes con IDCV que fallan en la correcta formación de células plasmáticas. En este subgrupo de pacientes con fenotipo B normal, la hipometilación de las células *Naive* observada en la CpG de *FOXO* se mantiene (Figura 55 c).

Se detectan diferencias de metilación para *AID* entre el grupo de pacientes con solo reducción de células Sm y el que subgrupo que tiene reducción de células de

memoria completa (células USm y células Sm) siendo este último en el que presentan mayores niveles de metilación en las células USm (P-valor=0,0022**). Además, el subgrupo de pacientes IDCv con reducción de células USm y Sm, exhibe unos niveles de metilación en las células USm mayores que el grupo control (P-valor=0,0110*) (Figura 55 a). Por su parte, los niveles de metilación de *AID* en las células Sm siguen siendo altas tanto si los pacientes solo presentan reducción de células Sm (y células USm normales) como si los pacientes tienen reducción completa de subpoblaciones de memoria, con respecto a los controles sanos (P-valor=0,0003***; P-valor=0,0001***, respectivamente).

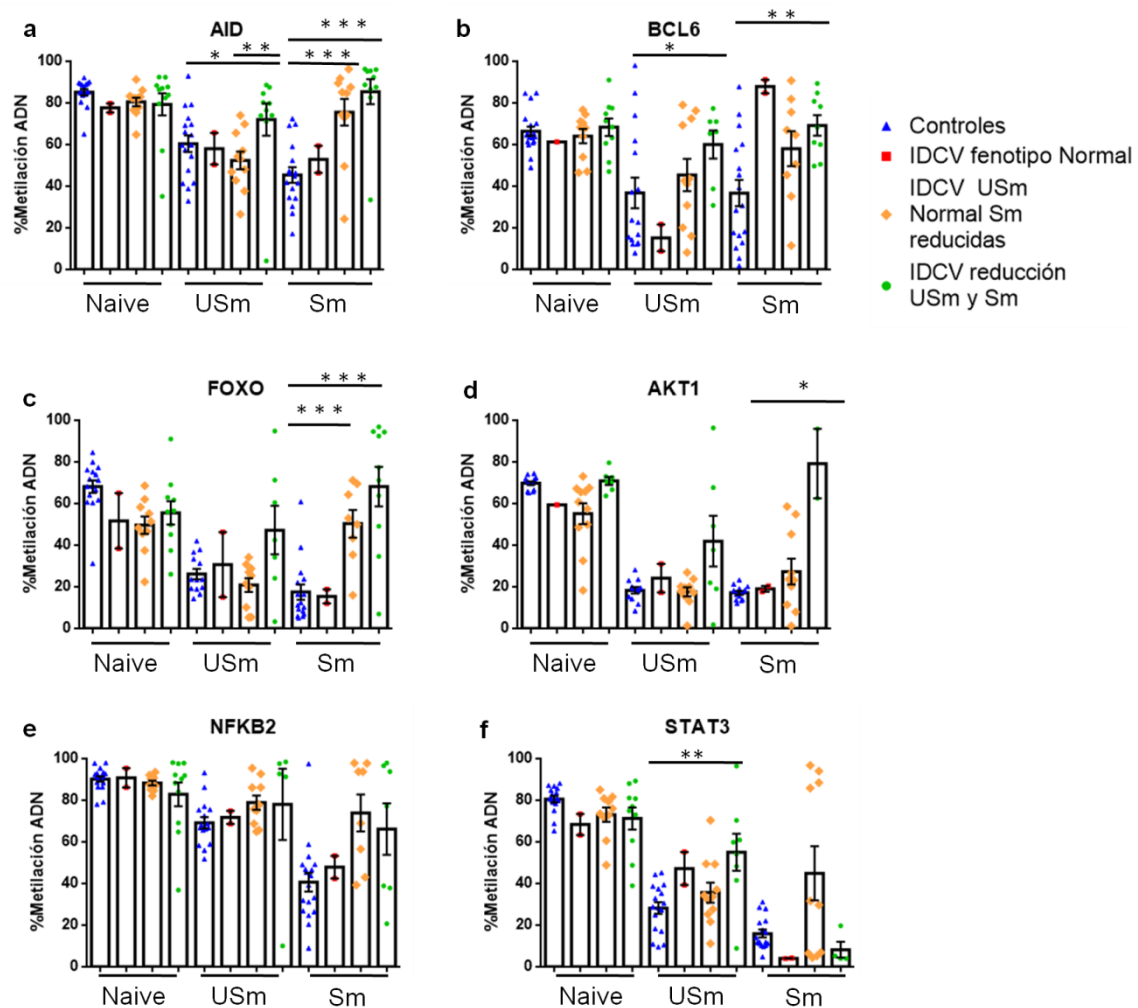


Figura 55: Metilación del ADN en las CpG seleccionadas en diferentes genes, en células *Naive*, USm y Sm de controles y pacientes IDCV según fenotipo B. Las cajas representan la media con EEM (Test Mann-Whitney *P-valor <0,05; ** P-valor <0,01; *** P-valor <0,001; **** P-valor <0,0001).

Para la CpG de *BCL-6*, las células USm de los pacientes IDCv, presentan niveles de metilación más altos cuando tienen reducción completa de las subpoblaciones de memoria con respecto a los controles (P-valor=0,0469*). De la misma manera, las células Sm de los pacientes IDCv, presentan niveles de metilación más altos cuando tienen reducción completa de las subpoblaciones de memoria con respecto a los controles (P-valor=0,0029**) (Figura 55 b). Tanto para *AID* como para *BCL-6* la subdivisión de los pacientes IDCv ha permitido distinguir hipermetilación para la subpoblación USm, no detectadas anteriormente, en aquellos pacientes que presentan reducción de células USm y Sm. La hipermetilación detectada en estas CpGs puede impactar en la generación de ambos compartimentos en pacientes IDCv.

En el gen *FOXO*, la CpG analizada en la subpoblación de células Sm muestra niveles más elevados de metilación en aquellos pacientes con reducción completa de células de memoria (USm y Sm) con respecto al grupo control (P-valor=0,0002***). En los pacientes que presentan USm normales y solo Sm disminuidas, también se mantienen las diferencias con respecto al grupo control (P-valor=0,0007***), pero no se observan diferencias entre los subgrupos de pacientes (Figura 55 c).

Los pacientes con reducción completa de células de memoria (USm y Sm) presentan niveles de metilación mayores en la CpG de *AKT1* con respecto al grupo control (P-valor=0,0190*) (Figura 55 d). Para la CpG analizada en *NFKB2* no se observan diferencias entre subgrupos de pacientes según el fenotipo B (Figura 55 e). Y por último, para la CpG situada en *STAT3* las diferencias de metilación señaladas en las células USm son más evidentes en el subgrupo de pacientes con reducción combinada de células USm y Sm con respecto a los controles (P-valor=0,0031**) (Figura 55 f).

Una observación interesante al analizar los niveles de metilación en diferentes subpoblaciones, es el hecho de que solo una de las CpG, en el gen *FOXO*, muestra diferencias en los niveles de metilación en la subpoblación *Naive* en pacientes IDCv con respecto a controles. Si estratificamos los pacientes IDCv en cuanto a su fenotipo, observamos que hay un grupo de pacientes IDCv con expansión de células transicionales (Figura 56). La expansión de este subtipo celular B se ha descrito previamente asociado con complicaciones de tipo linfoproliferativas. Cuando reanalizamos los niveles de metilación de *FOXO*, atendiendo a los subgrupos de pacientes por expansión o no de células transicionales, detectamos que aquellos

pacientes sin dicha expansión presentan niveles de metilación de *FOXO* aún menores con respecto a los controles sanos (P-valor=0,0003).

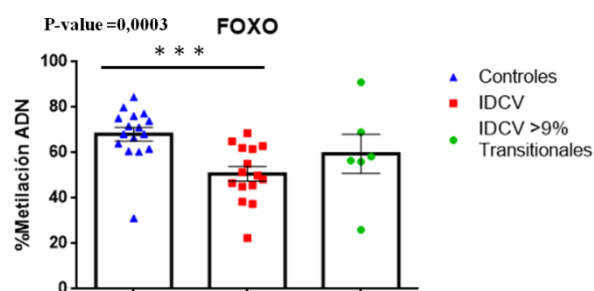


Figura 56: Metilación del ADN en las CpG de *FOXO*, en células *Naive* de controles, pacientes IDCV sin expansión de células transicionales y pacientes IDCV con expansión ($\geq 9\%$). Las cajas representan la media con EEM (***) P-valor <0,001; Test Mann-Whitney).

Historia replicativa de las células B y metilación del ADN

Para identificar en profundidad los posibles factores a lo largo de la diferenciación B, que estén contribuyendo con la alteración en la desmetilación observada en las células Sm de los pacientes IDCV, determinamos la historia replicativa de las subpoblaciones B de pacientes IDCV y controles. En las mismas muestras en las que se ha analizado la metilación, en las poblaciones B aisladas por *sorting* (*Naive*, USm y Sm) calculamos el número de divisiones celulares que han sufrido.

Cuando se compara el número total de divisiones celulares en las diferentes subpoblaciones B, se observa que las células *Naive* de los pacientes IDCV se dividen de media más veces que las mismas células en los controles sanos (P-valor<0,0001). Mientras que no se observan diferencias en el número total de divisiones celulares de las subpoblaciones B USm y Sm (Figura 57). Sin embargo, si analizamos en número de divisiones celulares que acumulan las células Sm desde el estadio *Naive*, observamos que las células Sm de los pacientes IDCV se han dividido menos veces en esta transición que los controles sanos (P-valor=0,0022) (Tabla 9 y Figura 58).

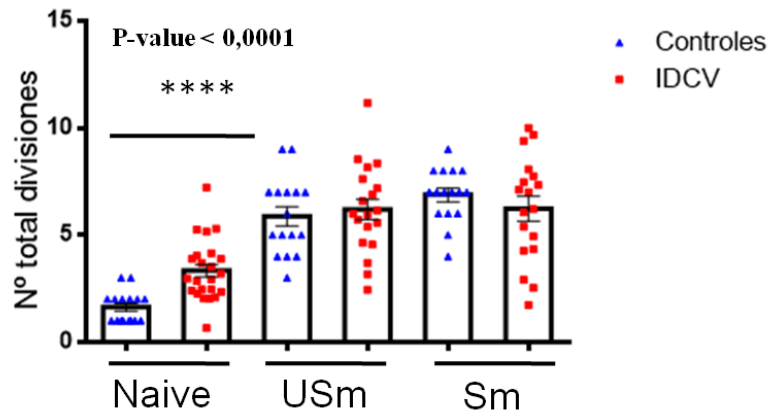


Figura 57: Número total de divisiones celulares en las células *Naive*, USm y Sm de pacientes y controles. Las cajas representan la media y EEM (**** P-valor <0,0001; Test Mann-Whitney).

Tanto los pacientes IDCV como controles alcanzan de media 6 divisiones en las células Sm, esto es debido a que los linfocitos B *Naive* de los pacientes se dividen más veces antes de la reacción del CG (de media 3,3 divisiones los pacientes IDCV frente a una media de 1,6 divisiones en los controles). Sin embargo, efectivamente en la transición de células *Naive* a células Sm las células de los pacientes experimentan de media 3,7 divisiones *versus* las 5,2 divisiones de media que sufren las células de los controles (Tabla 9 y Figura 58).

Tabla 9: Descripción de la media de las divisiones celulares de cada subpoblación B y el número de divisiones celulares que ocurren entre la transición de células *Naive* y células Sm.

Nº divisiones celulares (media)	<i>Naive</i>	USm	Sm	Transición <i>Naive</i> - Sm
Controles	1,6	5,9	6,9	5,2
IDCV	3,3	6,2	6,2	3,7

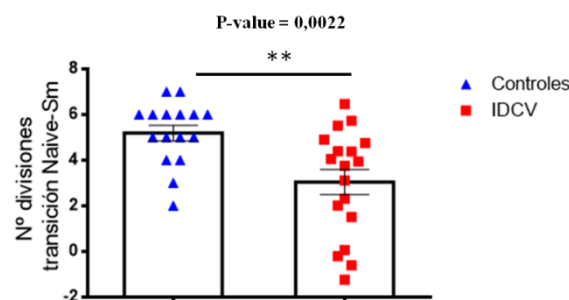


Figura 58: Número de divisiones celulares que se acumulan desde estadio *Naive* a linfocitos Sm. Las cajas representan media y EEM (** P-valor <0,01; Test Mann-Whitney).

Evaluamos si la desmetilación aberrante que se observa en las células Sm de los pacientes con IDCV es consecuencia de una proliferación disminuida entre la transición de células *Naive* a Sm. Las correlaciones se hacen entre el número de divisiones de las células Sm acumuladas desde el estadio *Naive* y la metilación del ADN en las células Sm. Las correlaciones entre niveles de metilación y las divisiones que han sufrido las células Sm, no son en ningún caso significativas para los controles.

No se observa correlación entre la hipermetilación de las células Sm de los pacientes IDCV y el menor número de divisiones sufridas desde el estadio de células *Naive* a células Sm, para las CpG analizadas de los genes *BCL-6*, *NFKB2*, *AKT1*, *MALT1*, *STAT3* (Tabla 10 y Figura 59). Sin embargo, para las CpG de *AID* y *FOXO* (Figura 59 a y c) sí que hay correlación negativa y significativa entre la metilación de dichas CpG en las células Sm y el número de divisiones celulares que han ocurrido entre la transición de células *Naive* y células Sm (Tabla 10 y Figura 59). Las células de los pacientes IDCV que han proliferado menos en dicha transición presentan niveles más elevados de metilación en las células Sm para *AID* y *FOXO*. Para los controles no hay correlación entre el número de divisiones celulares y la metilación de las células Sm.

Tabla 10: Coeficientes de correlación r de Spearman y P-valor del análisis realizado entre el número de divisiones desde células *Naive* a células Sm y el porcentaje de metilación del ADN para las CpGs.

<i>AID</i>	Controles	IDCV	<i>FOXO</i>	Controles	IDCV
Spearman r	0,2119	-0,8643	Spearman r	-0,0734	-0,6067
P-valor	0,4283	<0,0001****	P-valor	0,6917	0,0072**
<i>BCL6</i>	Controles	IDCV	<i>AKT1</i>	Controles	IDCV
Spearman r	-0,0988	-0,0725	Spearman r	-0,1953	-0,650
P-valor	0,6078	0,8083	P-valor	0,4064	0,066
<i>MALT1</i>	Controles	IDCV	<i>NFKB2</i>	Controles	IDCV
Spearman r	-0,3394	-0,4750	Spearman r	-0,1875	-0,0279
P-valor	0,1642	0,0759	P-valor	0,4017	0,9388
<i>STAT3</i>	Controles	IDCV			
Spearman r	0,3993	-0,3986			
P-valor	0,1258	0,2010			

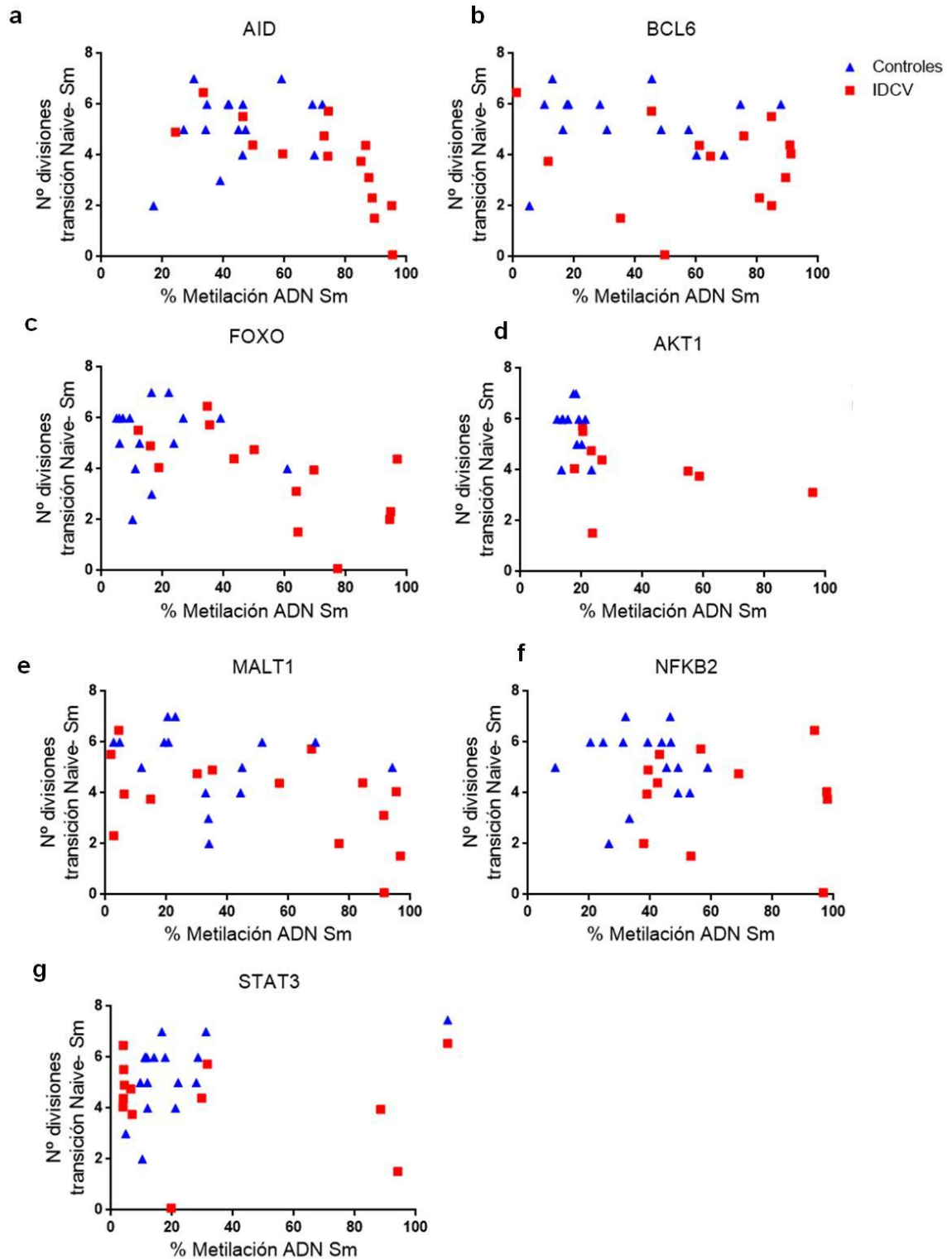


Figura 59: Correlaciones entre el número de divisiones celulares en la transición de células *Naive* a células *Sm* y el porcentaje de metilación del ADN para las CpG analizadas en los genes que mostraban diferente metilación entre pacientes con IDC y controles.

Frecuencia de las hipermutaciones somáticas en subpoblaciones B

Uno de los eventos que da lugar a la diversificación de la respuesta en la diferenciación B tardía, es la generación de Ig con diferentes subtipos. De $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ que presentan las células *Naive* a otros subtipos por la CSR, mientras que la maduración de la afinidad tiene lugar por la SHM. La frecuencia de las hipermutaciones somáticas (SHM) se ha analizado en las mismas muestras de subpoblaciones B aisladas por *sorting* (*Naive*, USm y Sm) utilizadas para el estudio de metilación.

Por definición las células *Naive* no sufren el proceso de SHM, siendo los valores cercanos a 0, ya que dicho proceso ocurre durante la reacción del CG tras la cooperación de los linfocitos B y T. Las células USm una parte habrán llevado a cabo la diferenciación del CG con el proceso de SHM que permite que las células aumenten la afinidad por el antígeno, mientras que otra parte de la población USm será independiente del CG. Los pacientes con IDCv muestran niveles reducidos de la frecuencia de las SHM en las células USm con respecto a los controles sanos (P-valor=0,0004). Las células Sm que por definición ya no expresan $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ y que por tanto han debido pasar por la reacción del CG también muestran en el caso de los pacientes con IDCv una frecuencia de las SHM muy reducida con respecto a los controles (P-valor=0,0001) (Figura 60).

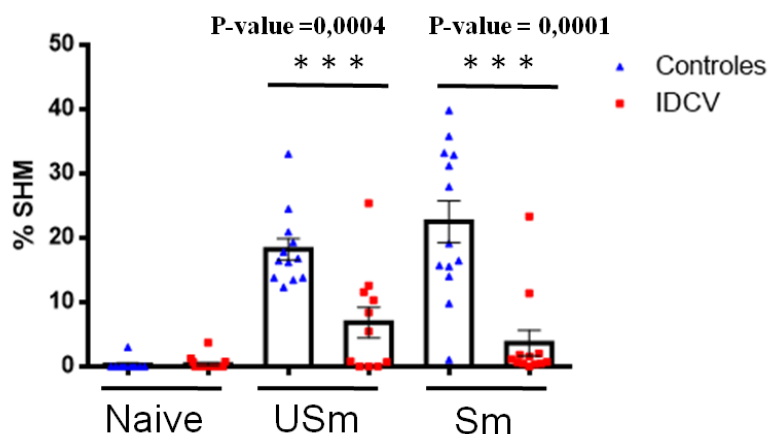


Figura 60: Frecuencia de las SHM (hipermutaciones somáticas), en las subpoblaciones B *Naive*, células de memoria USm y Sm en controles y pacientes IDCv. Las cajas representan la media y EMM (Test Mann-Whitney).

Modelo de activación y cambio de isotipo *in vitro*

Para investigar la posibilidad de que la desmetilación activa esté detrás de los cambios de metilación observados desde las células *Naive* y las células *Sm*, hemos optimizado un sistema de activación *in vitro* partiendo de células B *Naive* de controles sanos, tratadas con los correspondientes estímulos (CD40L e IL-21) que se diferencian a células que expresen IgA^+ y que por tanto progresivamente hayan ido perdiendo la expresión de IgM e IgD . Para ello a día +6 y +9 del cultivo se aíslan las células que sigan expresando $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ y las que expresen por otro lado IgA^+ mediante separación por *sorting*. Así mismo se obtienen células *Naïve* mantenidas en cultivo y no estimuladas. Se realiza la reacción de pirosecuenciación para las CpG de los genes *AID* y *AKT1*.

Las células *Naive* no estimuladas, presentan unos niveles de metilación altos, característicos de las células *Naive* tal y como se ha descrito anteriormente (Figura 61). Las células *Naive* activadas que siguen expresando $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ a día 6, empiezan a tener una pérdida progresiva de metilación, que se acentúa a día +6 en aquellas células que han hecho el cambio de isotipo *in vitro*. A día +9 se observa la tendencia de desmetilación en las células *Naive* activadas que siguen expresando $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ y de nuevo las IgA^+ que son capaces de desmetilar un poco más las dos CpG elegidas *AID* y *AKT1*. Este primer enfoque experimental en linfocitos B *Naive* de controles, supone el punto de partida para futuros estudios de desmetilación *in vitro*.

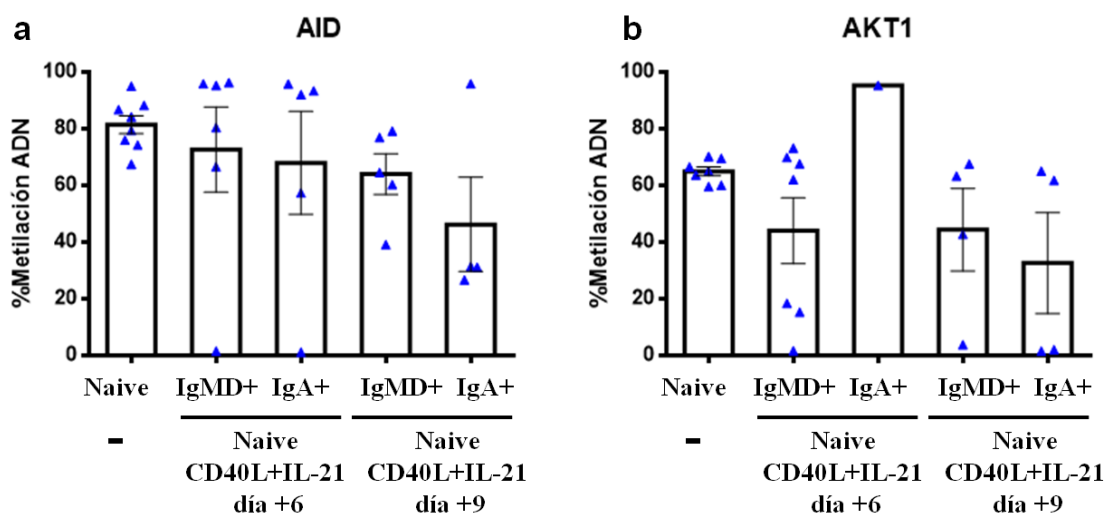


Figura 61: a metilación del ADN en células *Naive* sin activar (-) y activadas con CD40L e IL-21 durante 6 y 9 días para las CpG estudiadas en el gen *AID* y b en el gen *AKT1*. Algunas células siguen expresando IgMD^+ mientras que otras han hecho el cambio de isotipo a IgA^+ .

Discusión

Discusión

Discusión de complicaciones y características de la cohorte estudiada

La inmunodeficiencia común variable es una enfermedad compleja, que agrupa a una serie de entidades patogénicas con hipogammaglobulinemia¹. La IDCV es probablemente una enfermedad multifactorial como refleja el hecho de que hasta el momento las causas monogénicas explican la etiología solo de un pequeño porcentaje de los pacientes diagnosticados^{1 2 16 127}. La variabilidad en la edad de debut, la presentación clínica, así como la progresión a veces observada desde formas más leves hasta las hipogammaglobulinemias más severas de la IDCV sugiere en algunas ocasiones un deterioro progresivo¹²⁸. La presencia de otras complicaciones clínicas, más allá de las infecciones, ponen de manifiesto la desregulación de la respuesta inmune presente en los pacientes con IDCV.

Un rasgo común a todos los pacientes es la alteración observada en los linfocitos B de la IDCV, tanto en su diferenciación, activación como supervivencia. Cuando comenzamos los primeros estudios solo unos pocos defectos genéticos habían sido asociados a la IDCV, varios consistían en mutaciones en genes específicos de linfocitos B, lo que sugería que un defecto intrínseco del linfocito B podría justificar el fenotipo de estos pacientes. Quisimos profundizar en posibles vías defectuosas de señalización intracelular en los linfocitos B, tratando de detectar posibles mecanismos patogénicos comunes en los pacientes como la posible alteración de la señalización dependiente de NFκB¹²⁹. Para ello aprovechamos la creciente disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos de proteínas intracelulares y los más novedosos reactivos y protocolos de tinción intracelular tratando de inferir por ejemplo un posible defecto en vías de activación. Por otro lado, decidimos explorar nuevas aproximaciones, partiendo de la hipótesis de la posible implicación de los defectos funcionales o de señalización del linfocito B podían ser consecuencia de una desregulación de control epigenético, por expresión de microARNs y a nivel de metilación, en genes clave para la diferenciación, activación y supervivencia del linfocito B. En colaboración con el grupo de Cromatina y Enfermedad del Instituto de Investigación Sanitaria de Bellvitge (Idibell) describimos por primera vez el papel de alteraciones epigenéticas en la IDCV, identificando cambios

relevantes en la metilación de las células B. En particular, la incapacidad de las células B *Naive* de los pacientes con IDCV en desmetilar en la transición hacia células de memoria.

Los pacientes con diagnóstico de IDCV tienen como rasgo compartido una alteración del compartimento linfoide B, con la incapacidad para producir anticuerpos y por tanto hipogammaglobulinemia. El grado de alteración de los linfocitos B es variable, con presencia de linfocitos B totales normales en algunos casos, mientras que en otros se encuentran reducidos, lo que sugiere un defecto madurativo B desde los estadios en médula ósea^{130 131}. Nuestro trabajo ha estado orientado al estudio de los posibles defectos moleculares del linfocito B en la IDCV. Por tanto el estudio no ha incluido por definición aquellos que carecían virtualmente de linfocitos B en sangre periférica. Esto ha de ser tenido en cuenta al comparar algunos datos con estudios de cohortes anteriores. Tal y como se ha reportado en otras series, los pacientes analizados presentan distintos grados de alteración del compartimento B, en algunos casos con reducción de subpoblaciones de memoria completa, en otros solo reducción de linfocitos Sm. E incluso pacientes con fenotipo B normal, pero que tampoco pueden formar células plasmáticas.

El 22% de los pacientes presentan expansión de linfocitos transicionales, que en una amplia cohorte de pacientes se relacionó con la presencia de linfadenopatías¹²⁶. Estas células transicionales son emigrantes recientes de la médula ósea, que en controles sanos no proliferan si no que se diferencian rápidamente a células *Naive*; la expansión de esta población en la IDCV se asocia con una cierta incapacidad de madurar o progresar hacia el siguiente estadio¹³².

En nuestra cohorte, el 29% de los pacientes presentan un incremento de células CD21^{low}, esta población es en cierto grado anérgica, posiblemente debido a un estado de preactivación que las hace parecer exhaustas, con baja proliferación en respuesta a estimulación del BCR, niveles reducidos de flujo de calcio tras activación y recientemente se ha descrito también una menor degradación de IKB α y de p65 al núcleo especialmente drástica en esta subpoblación⁷⁶. La expansión de este tipo celular se relaciona en la patogenia de IDCV con la presentación clínica de esplenomegalia y complicaciones autoinmunes⁴³.

Dada la heterogeneidad en la IDCV ya se han detallado las características clínicas más relevantes de los pacientes en el apartado de Resultados. Un pequeño porcentaje de los pacientes no sufren complicaciones más allá de las infecciones, que suelen estar bien controladas gracias al tratamiento sustitutivo con gammaglobulina. Sin embargo, este tratamiento tiene poca repercusión en la mejoría de otras complicaciones clínicas. En el presente trabajo se han incluido 57 pacientes con diagnóstico de IDCV.

Las características en cuanto a sexo y edad de los pacientes son parecidas a las descritas en otras cohortes, con igual prevalencia de sexos, pero el diagnóstico se realiza de media en edades más tempranas en hombres que en mujeres. Esta peculiaridad puede estar relacionada con la sospecha en varones de agammaglobulinemias ligadas al cromosoma X por mutaciones en *BTK*¹²⁵.

Al igual que lo observado en otras cohortes los procesos autoinmunes aparecen en torno a un 30% de los pacientes (Tabla 11), siendo las citopenias autoinmunes las de mayor prevalencia, en muchos casos es la complicación con la que debutan los pacientes incluso antes de las infecciones de repetición¹. Las causas de la autoinmunidad en los pacientes IDCV no están claras, se ha especulado con la desregulación presente en las células B, con un fallo en la eliminación de las células B autorreactivas¹³³. Entre los hallazgos inmunológicos descritos en pacientes con manifestaciones autoinmunes se han encontrado números reducidos de células T reguladoras (Treg) y de células CD8⁺, los pacientes suelen tener reducidas las células Sm y elevadas las células CD21^{low}. También se ha descrito asociado a las citopenias autoinmunes niveles elevados de BAFF y APRIL que pueden estar implicados en la expansión de clones autorreactivos¹³⁴.

Las complicaciones linfoproliferativas incluyen presencia de adenopatías, hiperplasia nodular linfoide y neumonía intersticial linfoide (LIP). Si tenemos solo en cuenta la presencia de adenopatías (42% de nuestra cohorte), obtenemos un resultado algo superior al que describen en otras cohortes³. En el artículo ICON 2016¹, describen la hiperplasia nodular en un 20% de su cohorte, resultado también similar al que nosotros obtenemos en nuestros pacientes (28%). Estudios llevados a cabo en pacientes con complicaciones inflamatorias y linfoproliferativas han descrito la asociación con la

presencia de poblaciones T CD8⁺ específicas expandidas como consecuencia de infecciones virales por Epstein Barr (EBV) y CMV ⁸².

Tabla 11: Comparación de nuestra cohorte con otras series publicadas.

Complicación /estudio	Cohorte La Paz N=57	ICON (2016) ¹	Clinical picture and treatment 2212 CVID European (2014) ¹²⁵ (N=2212)	CVID división into distinct clinical phenotypes (2008) ³ (n=424)	Euroclass trial (2007) ¹³² (n=303)
Edad diagnóstico (media en años)	32	35,3	Infancia y entre 30-40 años	35,5	35
Sexo (mujeres, hombres)	(51%; 49%)		(51%; 49%)	(58%; 42%)	(56%; 44%)
Autoinmunidad (%)	31%	25-30 (%)	29%	42%	(20%+20% citopenias)
Linfoproliferación			-		
Linfoadenopatías	42%	-		15%	26,2%
Hiperplasia nodular linfoide	28%	20%		-	-
Bronquiectasias	42%	-	23%	(3%LIP)	-
Granulomas	12%	(8-22%)	9%	8%	11,6%
Esplenomegalia	37%	26%	26%	30%	40,5%
Enteropatía	21%	9% + (4-12% EII)	9%	9%	-
Malignización (linfoma)	5%	6%	3%	3%	-
Tumores sólidos	1,75%	0,6%	5%	3% (otros)	-

La presencia de esplenomegalia se encuentra presente entre entre un 26-40% de los pacientes según las series, rangos similares a los que se presentan en nuestra cohorte. Las causas de la esplenomegalia no están bien descritas, sin embargo las biopsias revelan una morfología aberrante en el bazo con hiperplasia y presencia de granulomas ¹.

La presencia de granulomas en torno al 12% de los pacientes, concuerda con lo reportado en otras cohortes. En realidad la presencia de muchas de estas complicaciones, granulomas, linfoproliferación, hiperplasia, no son más que las

manifestaciones de una profunda infiltración linfoide policlonal en los tejidos. En los pulmones la aparición de granulomas junto con los infiltrados linfoides da lugar al llamado GLILD. Dicha inflamación pulmonar de forma crónica dificulta la aireación de los pulmones, dando lugar a bronquiectasias lo que conlleva a una inflamación progresiva y más severa que es la responsable de las principales causas de mortalidad en los pacientes con IDC¹³⁵.

Las bronquiectasias son alteraciones que se presentan en los pulmones como consecuencia de infecciones de repetición que acaban provocando un ensanchamiento de las vías respiratorias. En nuestra cohorte la presencia de bronquiectasias se observa en un 42% de los pacientes en otros estudios cifran esta complicación hasta en el 50% de los pacientes ¹³⁶.

Dependiendo de la forma de contabilizar en los diferentes estudios las complicaciones intestinales, en algunos casos cifran la incidencia de enfermedad gastrointestinal en forma de diarreas crónicas o intermitentes entre un 20-60% de los pacientes de IDC¹³⁷. Las diarreas crónicas acaban progresando a un tipo de síndrome de malabsorción que lleva en ocasiones a un estado de malnutrición en los pacientes, se describieron en un estudio retrospectivo hasta en un 54% de los pacientes IDC y un 44% de pacientes con hiperplasia nodular linfoide ¹³⁸. En cuanto a la enteropatía no infecciosa describen una prevalencia entorno al 12% de los pacientes, que se puede manifestar como un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal ^{133 138 139}. La prevalencia de la patología intestinal en los IDC se ha descrito asociada a la disminución de células plasmáticas, la hiperplasia linfoide, la presencia de infiltrados linfocitarios en las biopsias, sin olvidar que el intestino constituye el tejido con más superficie con células productoras de Igs, sobre todo IgA.

La malignización es otra de las complicaciones frecuentemente asociadas a la IDC. Hace unos años la prevalencia de cáncer gástrico era ligeramente superior, debido a su estrecha relación con la infección por *H. pylori* que en la actualidad se ha reducido por los tratamientos antibióticos efectivos. La malignización de tipo B suele estar presente en torno a un 3-5% de los pacientes según las diferentes cohortes ¹²⁵.

Discusión general de los resultados

Como resumen conjunto, nuestros resultados sugieren que los linfocitos B de los pacientes con IDCV acumulan defectos en las vías de señalización clave para la supervivencia del linfocito B (Figura 62). Estos defectos consistirían en una menor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en linfocitos B de memoria, defectos de señalización estudiando la vía de NFκB a través de dos de sus dianas *BCL-2* y *BCL-XL*, comprobando una menor expresión de sus ARNm tras activación, la expresión elevada del microARN-34a en linfocitos B primarios que correlacionan negativamente con la expresión de su diana la proteína Bcl-2. También confirmamos la alteración en la señalización intracelular de la vía PI3K-Akt tras activación del BCR, testando dos proteínas intermedias en la cascada de señalización como son Akt y S6, que muestran una menor fosforilación.

Como reflejo del bloqueo en la diferenciación del linfocito B a nivel de la reacción del CG, se detecta expresión disminuida de *AID* tras activación de células *Naive*, así como reducción de la frecuencia de SHM en las poblaciones de memoria, lo que indica respuestas deficientes a antígenos.

Además, identificamos la incapacidad de los linfocitos B *Naive* de desmetilar en la transición hacia células B de memoria en algunos genes clave para la biología del linfocito B, con especial relevancia *AID*. Parece existir una desviación de la pauta habitual de divisiones en la diferenciación periférica de los linfocitos B, se constata con un aumento de las divisiones en los linfocitos B *Naive*. Sin embargo, el análisis del número de divisiones celulares que se acumulan en periferia entre los estadios de linfocitos B *Naive* y los linfocitos de memoria Sm son menores que en los controles.

Cada uno de estos procesos se discuten de forma más detallada en los siguientes apartados.

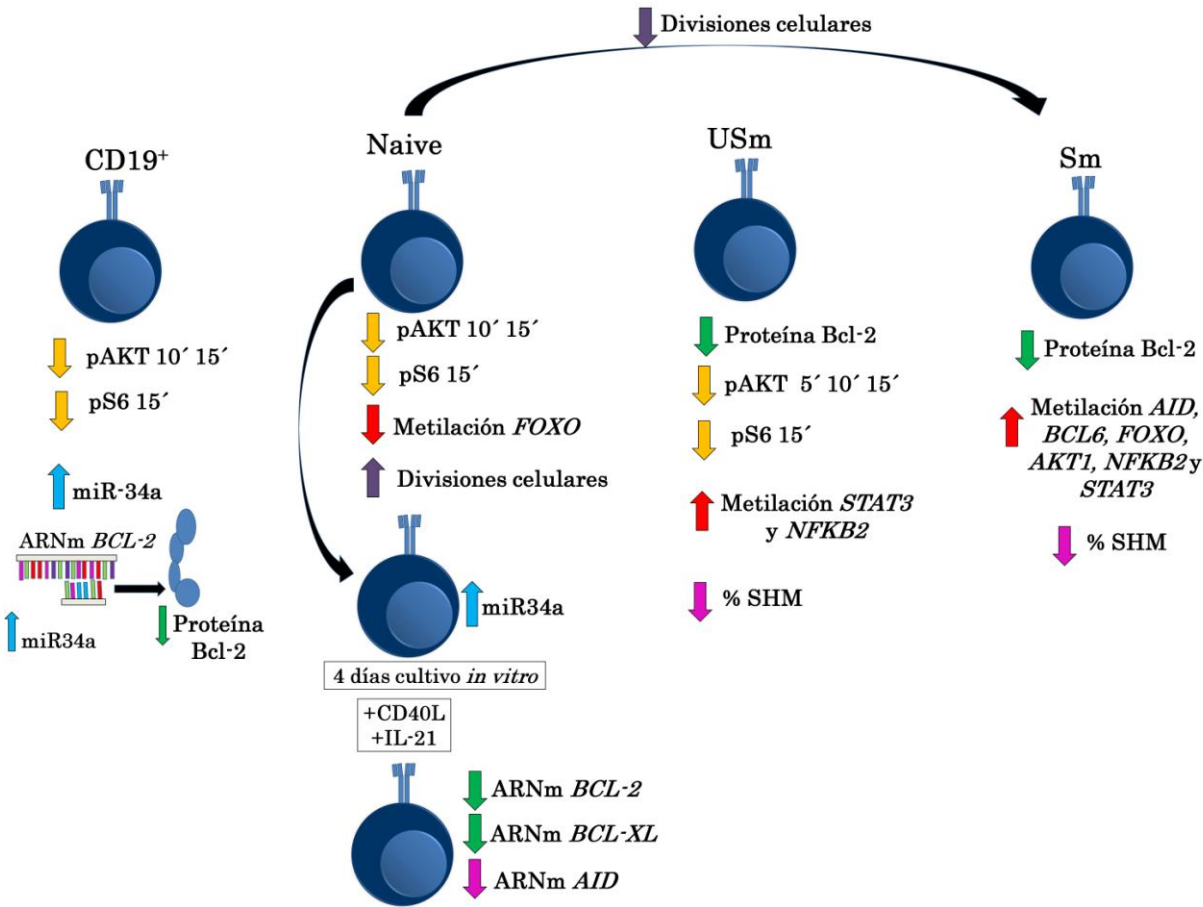


Figura 62: Resumen de resultados en los linfocitos B de pacientes IDCV, las flechas indican aumento o disminución con respecto a los controles sanos analizados.

Señalización intracelular

La desregulación del linfocito B en la patogenia de la IDCV puede ser un buen punto de partida para tratar de entender la compleja alteración del sistema inmune que ocurre en estos pacientes. La incapacidad de los linfocitos B para diferenciarse correctamente, por defectos en la señalización o supervivencia siempre ha sido una de las hipótesis centrales de esta tesis doctoral. La alteración en vías de señalización clave para el linfocito B como la activación de NFκB y el resto de complejas vías subyacentes al BCR han sido motivo de estudio. El bloqueo madurativo por defectos en la supervivencia y/o activación de las células *Naive*, parece estar detrás de la incapacidad de continuar su correcta diferenciación, así como la reducción de linfocitos Sm recientemente incluidos como criterio para el diagnóstico de IDCV, ponen de manifiesto posibles alteraciones en la supervivencia de los linfocitos B.

El mantenimiento de células B maduras en circulación requiere de la confluencia de múltiples señales vía BCR, receptores de la familia del TNF, la señalización mediada por BAFF, así como de receptores de citoquinas, que dan lugar a la activación del factor de transcripción NFκB, que se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de diversos genes implicados en activación y supervivencia, entre otros. NFκB es un importante regulador de varios miembros antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, en especial de Bcl-2 y Bcl-xl⁶⁰.

Uno de los objetivos era analizar la expresión de proteínas antiapoptóticas en diferentes poblaciones B para corroborar si la disminución de las células Sm está relacionada con un desbalance en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2.

La correcta activación de las células B durante los primeros momentos tras la activación permite la diferenciación de las células *Naive* hacia células de memoria, para que estas últimas sean capaces de responder de forma rápida y eficaz durante la respuesta inmune. Lo que diferencia a ambos tipos de células (*Naive* y memoria) es la distinta expresión de genes y la variedad de estímulos que reciben, entre ellos la ayuda de las células T¹⁴⁰.

Las células B de memoria permanecen en circulación durante largos períodos de tiempo, gracias no solo al equilibrio de los distintos miembros pro y antiapoptóticos de

la familia Bcl-2, sino también a la llamada señalización tónica que debe ocurrir en las células B en circulación ¹⁴⁰. En linfocitos B, la señalización mediada por BAFF induce la activación de NFκB y el aumento de la expresión de miembros de la familia Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-xl y MCL-1. Además la activación del BCR está implicada en controlar la expresión de proteínas de la familia de Bcl-2, de especial relevancia se ha descrito el aumento de la expresión de Bcl-2 en las células B de memoria ^{26 60}.

En efecto, tal y como se ha expuesto, hemos observado en controles el incremento de la expresión de Bcl-2 en los linfocitos B de memoria. Sin embargo, a nivel de proteína y comparando las intensidades medias de expresión en el estadio entre células *Naive* y Sm, observamos un incremento mucho menor para Bcl-2 en los pacientes. Esto es debido a que los linfocitos USm y Sm de los pacientes IDCIV presentan niveles reducidos de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los pacientes que muestran una alteración del fenotipo B más abrupto, con disminución de células de memoria (tanto USm como Sm) o la reducción de las células Sm es severa (<2%) tienen una menor expresión de la proteína Bcl-2 en las subpoblaciones B de memoria. Estos resultados sugieren que la menor expresión de Bcl-2 es un factor que puede estar limitando la capacidad de estos pacientes de mantener un compartimento B de memoria adecuado.

El análisis de Bcl-xl, otra proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2, no muestra diferencias significativas en su expresión en diferentes estadios B en pacientes IDCIV con respecto a controles sanos. Sin embargo, sí que se observa una tendencia al aumento de la expresión de Bcl-xl en las células *Naive*, en aquellos pacientes con disminución de las células B de memoria totales. Aún no tenemos una clara explicación a este fenómeno. Una hipótesis es que sea secundaria, de forma compensatoria en los linfocitos B *Naive* ante la imposibilidad de su correcta diferenciación hacia células B de memoria. No obstante, el patrón de expresión de la proteína Bcl-xl en las tres subpoblaciones B estudiadas muestra claras diferencias con respecto a Bcl-2.

Esta discordancia de resultados entre los dos miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, cuya transcripción está muy modulada por la actividad de NFκB con homología funcional pero con actividades complementarias, haciendo que participen en distintos programas de supervivencia, en distintas células y en distintos estadios de diferenciación. De modo que Bcl-2 se expresa mayoritariamente en células *Naive* y

memoria, como se muestra en la Figura 21 de Resultados, presentando una dinámica de mayor expresión durante la diferenciación B de controles sanos. Mientras que para Bcl-xl está descrito que se expresa débilmente en células B *Naive* y de memoria pero es abundante en las células del GC donde su regulador c-Rel se expresa de forma constitutiva, de ahí que la cinética observada en la Figura 23 de resultados apenas muestre cambios en la expresión de Bcl-xl entre células *Naive* y de memoria Sm⁶⁵.

Para profundizar un poco más en el posible defecto de señalización que impide a los linfocitos B de los pacientes aumentar la expresión de Bcl-2 necesaria para progresar a los estadios más diferenciados, decidimos poner a punto un sistema de activación *in vitro*. Con este sistema se pretendía activar a linfocitos B *Naive* con dos estímulos (CD40L e IL-21) capaces de activar la vía de señalización de NFκB y medir la expresión de ARNm de dos de sus dianas *BCL-2* y *BCL-XL*. La activación de células *Naive* con CD40L e IL-21 conlleva a una activación y diferenciación de la célula B que intenta reproducir *in vitro* las condiciones que ocurren durante la reacción del CG *in vivo*, gracias a la ayuda proporcionada por los linfocitos T^{28 141}.

En efecto, observamos que en los controles sanos la activación produce un aumento en la expresión de los ARNm de *BCL-2* y *BCL-XL*. Sin embargo, las células *Naive* de los pacientes con IDCV no son capaces de alcanzar los niveles de expresión de los controles. Encontramos diferencias significativas en el aumento de expresión *BCL-XL*, cuyo aumento parece crucial en las células del centro germinal *in vivo*, que expresan mucho más *BCL-XL* que las *Naive* o las de memoria⁶⁵. Con la estimulación que estamos utilizando *in vitro*, reproducimos en parte, el estímulo que conduce a los linfocitos B *Naive* a un estadio precoz pre CG *in vivo*. Los pacientes con reducción de células USm y Sm presentan una disminución más severa del ARN m de *BCL-XL* tras activación.

La reducción del ARNm de *BCL-2* no es tan drástica en los linfocitos B *Naive* de los pacientes IDCV respecto a los controles sanos. Se ha descrito que durante este estadio de células del CG, *BCL-2* muestra *in vivo* una expresión reducida⁶⁵. Puesto que durante este estadio ocurren importantes procesos como la recombinación somática y el cambio de isotipo, que requieren como mecanismo de tolerancia periférica que las células autorreactivas generadas en ese proceso se eliminen por apoptosis, siendo los niveles de la proteína Bcl-2 reducidos en este estadio⁶⁹. De hecho, cuando se

correlacionan los niveles de los genes entre sí, se constata que los ARNm antiapoptóticos de *BCL-2* y *BCL-XL* aumentan a la par en los controles sanos tras activación, en los pacientes IDCV no se observa dicha correlación positiva entre los dos ARNm de proteínas antiapoptóticas.

Un estudio anterior de otros autores ya señalaba que la expresión de *BCL-2* es más constitutiva que *BCL-XL*, observando que tras estimulación de células B de memoria con CD40L se producía incremento de *BCL-XL* tras 24 horas de estimulación pero apenas observaban cambios para *BCL-2* ¹⁴².

Algunos estudios previos han descrito el incremento de apoptosis espontánea en las células B de pacientes IDCV, así como un aumento de la expresión del receptor de muerte FAS ⁸⁵. Clemente et al, ⁷⁴ también reportaron un aumento del ligando de la familia del TNF que induce apoptosis (TRAIL) en los linfocitos B de memoria totales (CD27⁺) en pacientes IDCV con reducción severa de dicha población ⁷⁴. Borte et al, ⁷⁵ constataron que la apoptosis espontánea en ausencia de estímulos es mayor en las células *Naive* de los IDCV, incluso superior a la de las células Sm. La IL-21 parece ejercer un efecto protector que depende del subtipo celular B y de la combinación con otros estímulos. En concreto la IL-21 potencia el efecto protector (antiapoptótico) de anti CD40 en las células Sm. La combinación de ambos tipos de estímulos induce proliferación en las *Naive* y las células B de memoria. Y cuando además se combina con IL-4, los tres estímulos reducen significativamente la apoptosis de las células *Naive* y B de memoria de la IDCV ^{73 75}.

En los linfocitos T de los pacientes con IDCV, también se han descrito alteraciones en su supervivencia, en concreto los pacientes con IDCV que presentan linfopenia CD4⁺ expresan mayores niveles de CD95 (FAS), aunque los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bax no mostraban alteraciones con respecto a los controles ^{72 85}.

Conociéndose la relevancia de la apoptosis en la supervivencia de los linfocitos B y ya descrita la predisposición de las células Sm en los pacientes IDCV a morir por apoptosis en ausencia de estímulos óptimos, en este trabajo se aporta por primera vez análisis de los niveles de Bcl-2 en las distintas subpoblaciones B y los ensayos de expresión de ARNm antiapoptóticos tras estimulación con CD40L e IL-21 en células *Naive* de pacientes con IDCV. Aportamos datos que sugieren un mecanismo molecular

de esa tendencia a la apoptosis, la posible menor activación de NFκB en los linfocitos B de los pacientes, que pueden tener una incapacidad para aumentar los niveles de ARNm *BCL-XL* lo que no favorecería la supervivencia en el proceso de maduración del CG, a la vez que expresan menos niveles de la proteína Bcl-2 que podría comprometer la supervivencia a largo plazo de los linfocitos B de memoria.

La activación de las células B conlleva a través de múltiples moléculas intermedias la transmisión de señales desde los receptores de superficie hasta la activación de importantes factores de transcripción como es NFκB, que da lugar como ya se ha comentado anteriormente a la transcripción de numerosos genes, entre ellos los de la familia de Bcl-2. Recientemente otro grupo ha publicado alteraciones en la vía canónica de NFκB, lo que viene a confirmar la validez de nuestra hipótesis de defectos de señalización de esta vía que estén impidiendo la correcta diferenciación, supervivencia y activación en los linfocitos B en la IDCV ⁷⁶. En concreto Keller et al, ⁷⁶ han identificado la alteración en la vía canónica de NFκB, debido a que los pacientes presentan menos degradación de IκBA (inhibidor de la señalización, que una vez degradado permite la translocación al núcleo de las subunidades p65/ p50 para iniciar la transcripción génica). De manera que existe una menor degradación de IκBA y una menor translocación de p65 en los linfocitos B de pacientes IDCV. Este defecto es más acusado en los pacientes con expansión de linfocitos CD21^{low}. Además, estos mismos autores también testaron el aumento de expresión que debían sufrir algunas de las dianas de NFκB, como es *BCL-XL*, ellos también observan una inducción menor en la expresión del ARNm de esta proteína en los pacientes comparado con los controles, tras estimular las células con anti IgM. Resultados comparables a los que hemos obtenido en nuestro sistema de activación *in vitro* de células *Naive* con CD40 e IL-21.

Como control positivo de la activación de las células *Naive* con CD40L e IL-21 se incluyó el análisis de *AID*. La expresión de *AID* en las células *Naive* se induce tras activación tanto de forma T dependiente como T independiente, así como por reconocimiento a través de TLR y del BCR. Estos estímulos inducen la expresión de *AID* unas 48 horas después de la activación, mediada por las vías de señalización canónica y no canónica de NFκB. Además de NFκB, la transcripción del gen *AID* está regulada por los factores de transcripción Hox4 ¹⁰⁷.

El ensayo llevado a cabo con células *Naive* estimuladas durante 4 días *in vitro* con CD40L e IL-21, produce la expresión de *AID* tanto en pacientes como en controles. Sin embargo, los niveles de expresión de *AID* están reducidos en las células de la IDCV con respecto a los controles. Esta reducción entre los pacientes IDCV presenta cierta heterogeneidad que puede deberse en parte a las diferentes características subyacentes en cada paciente, como puede ser el diferente grado de alteración en el bloqueo de la diferenciación B. De esta forma, se observa que los niveles de expresión de *AID* están más reducidos en pacientes IDCV con reducción de subpoblaciones de memoria, en concreto es más significativo en aquellos pacientes que tienen reducidas las células Sm. Sin embargo, incluso entre los pacientes que presentan una distribución de subpoblaciones B normal se mantiene la expresión de *AID* disminuida con respecto a los controles sanos.

AID induce dos procesos fundamentales que ocurren en la reacción del CG, el cambio de isotipo por CSR y la maduración de la afinidad por SHM. La reducción de las células Sm que hayan hecho el cambio de isotipo, revela el cierto bloqueo que existe en la generación de células con isotipos distintos de Igs, junto con la menor viabilidad que *a priori* parecen tener esas células en los pacientes IDCV.

La reducción de la expresión de *AID* tras activación de células *Naive* en los pacientes muestra su evidente repercusión funcional si analizamos la frecuencia de las SHM que generan en condiciones óptimas células Sm de alta afinidad. El estudio de la frecuencia de las SHM en las subpoblaciones B que sufren los pacientes de IDCV de nuestra cohorte, pone de manifiesto la reducción evidente con respecto a controles en las subpoblaciones B USm y Sm. Esto es indicativo de una deficiente maduración de la afinidad en las células de memoria que han debido pasar por la reacción del CG, y refrenda resultados previos de van Zelm et al, en el mismo sentido⁷⁰.

Los defectos observados en los estudios de activación *in vitro*, no parecen deberse a una menor capacidad de respuesta de activación general en los linfocitos B de los pacientes, para confirmar que la activación *in vitro* de células B *Naive* con CD40L e IL-21 se estaba produciendo correctamente, se testó la expresión de dos moléculas de activación CD69 y CD86 por citometría de flujo. En sangre periférica tan solo un pequeño porcentaje de células expresan CD69, su expresión se induce rápidamente tras activación en linfocitos B, T y NK. Mientras que CD86 es una proteína de membrana

perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en células presentadoras de antígeno y células B activadas ¹⁴³ .

Las células *Naive* de los pacientes con IDCV en cultivo al cabo de 4 días expresan los marcadores de activación CD69 y CD86 a niveles parecidos a los de los controles. La expresión de CD86 en las células B activadas, da idea de la capacidad adquirida de las células B para actuar como presentadoras de antígenos ¹⁴⁴. Estudios previos mostraban un defecto en el incremento de expresión de CD69 y CD86, por ejemplo Lougaris et al, ¹⁴⁵ observaban expresión reducida de CD69 y CD86 en PBMCs totales estimulados con CpG ¹⁴⁵. En otro caso Groth et al, ¹⁴⁶ también encontraron expresión disminuida en las células *Naive* de los pacientes IDCV pero estimuladas con anti IgM e IL-2 ¹⁴⁶. Los resultados son solo aparentemente discordantes con nuestros hallazgos, si consideramos que difiere el tipo de células activadas (PBMCs totales con el conjunto de subpoblaciones linfocitarias) y la estimulación utilizada, en el segundo estudio activan células *Naive* con dos estímulos menos potentes que los que nosotros utilizamos CD40L e IL-21, que numerosos estudios avalan como los estímulos más apropiados y que generan una respuesta más potente ⁷⁵.

Diversos procesos fundamentales para los linfocitos B como son la activación, proliferación y diferenciación se inician tras la unión del antígeno al BCR. Dicha unión provoca la fosforilación de proteínas asociadas al BCR, que irán propagando la señal y acaban activando a moléculas efectoras que regulan la activación de factores de transcripción, que tras su translocación al núcleo dan lugar a la expresión génica ¹⁴⁷.

Otro de los objetivos de la presente tesis, era testar posibles alteraciones de las vías de señalización subyacentes al BCR, por ocupación de receptores de membrana que inician una red de vías de señalización moduladas por fosforilación que finalmente convergen para actuar sobre la expresión génica y los niveles de proteínas. Para ello, se estimularon PBMCs con anti IgM a tiempos cortos (5, 10 y 15 minutos), puesto que la fosforilación mediada por la activación del BCR se produce de forma muy rápida, tal y como está descrito en la literatura se pueden observar picos de fosforilación a tiempos menores de 5 minutos ¹⁴⁷ y se analizó la activación a través de la fosforilación de dos efectores del BCR: Akt y S6.

Los datos de fosforilación de Akt y S6 tras tiempos cortos de estimulación con anti IgM sugieren un defecto de fosforilación presente en las células de la IDCV. En concreto, nuestros análisis revelan cuando se analiza la población CD19⁺ al completo que los linfocitos B de los pacientes con IDCV experimentan menores niveles de fosforilación de Akt tras 10 y 15 minutos de estimulación con anti IgM, lo mismo se observa en la población mayoritaria dentro de las células CD19⁺, las células *Naive*. Mientras que como ya se ha comentado anteriormente las células USm son las células que más receptores tienen para IgM, los pacientes presentan una severa reducción de la fosforilación en esta población para todos los tiempos estudiados. Las células USm tienen una IMF de IgM mayor que las *Naive*, de tal manera que la activación con anti IgM activa principalmente a las células *Naive* y USm. El umbral de activación de las USm es menor por varias razones, tienen más receptores de superficie y cuentan con más niveles totales de la proteína Syk asociada al BCR. En cambio las células *Naive* están más reguladas y necesitan señales más intensas para activarlas, de manera que la inducción de la fosforilación en las *Naive* es más costosa, lo que no significa que no sean capaces de responder a estímulos ¹⁴⁷.

Se conoce el papel de Akt en la proliferación y supervivencia de las células, del mismo modo es conocida su implicación en los procesos linfoproliferativos y autoinmunes. Estas dos complicaciones aparecen con cierta frecuencia, tal y como se ha mencionado, en los pacientes con IDCV. Por ello, seleccionamos dentro del estudio de fosforilación aquellos pacientes que presentaron manifestaciones autoinmunes y linfoproliferativas para testar si en estos subgrupos de pacientes presentaban niveles elevados de fosforilación. Sin embargo, estos subgrupos de pacientes con IDCV siguen presentando niveles de fosforilación inducida tras activación reducidos.

Mientras trabajábamos en poner a punto la técnica de fosforilación de Akt, se describió una IDP por mutaciones por ganancia de función en *PIK3CD*, una de las subunidades de PI3K, en las que se describió un aumento de función en la vía de PI3K-Akt ^{12 148}. En efecto, comprobamos una fosforilación basal muy elevada de un paciente de nuestra consulta diagnosticado con una mutación en *PIK3CD*. Los primeros pacientes descritos en los artículos originales, con mutaciones en *PIK3CD* habían sido extraídos en algunos casos de cohortes de pacientes diagnosticados como IDCV, una característica de estos pacientes son precisamente los fenómenos linfoproliferativos. La puesta a punto de la técnica de fosforilación de Akt y S6, que veníamos desarrollando

para estudiar esta vía en la IDCV, ha sido de gran utilidad como técnica diagnóstica de pacientes con mutaciones en *PIK3CD*, así como en otras mutaciones recientemente descritas en la literatura y también encontradas en algunos de nuestros pacientes en *PIK3R1* y *PTEN*, con fosforilaciones basales de Akt y/o S6 aumentadas en los linfocitos B de los pacientes afectados.

En la cohorte de IDCV estudiada, al analizar la fosforilación basal de Akt se identificaron cinco pacientes con una fosforilación basal muy incrementada (más de 2SD de la media de los controles). Ante una posible sospecha que se trataran de pacientes con mutación en *PIK3CD*, se analizaron las mutaciones más frecuentes en dicho gen, resultando el estudio en los cinco pacientes negativo. Estos pacientes están, en el momento de finalizar esta tesis, en estudio mediante un panel de secuenciación masiva de genes relacionados con IDP, para descartar posibles mutaciones en genes relacionados con esa vía de activación. Cabe destacar, que a pesar de presentar fosforilación basal incrementada, los cinco pacientes muestran una cinética de activación parecida al del resto de los pacientes con IDCV. De esta forma hemos confirmado nuestra hipótesis de partida de vías de señalización alteradas en linfocitos B de pacientes IDCV, pero también nos ha servido para poder subclasificar a un pequeño subgrupo de pacientes sobre la posible base de un mecanismo patogénico común, aún no sabemos si de base genética o epigenética.

Los defectos de fosforilación de S6 observados a tiempos largos de estimulación en los linfocitos B de los pacientes IDCV, vuelven a poner de manifiesto la desregulación en la señalización intracelular que impide la correcta activación de moléculas intermedias como S6 y con funciones tan relevantes, que pueden estar contribuyendo a impedir una correcta progresión del ciclo celular y la supervivencia de las células con señalización defectuosa. Cabe destacar que los pacientes que presentan complicaciones autoinmunes y linfoproliferativas muestran un ligero aumento de la fosforilación de S6, más evidente a tiempos cortos de estimulación (5 y 10 minutos) con respecto al resto de IDCV. Lo que de nuevo nos lleva a la posible identificación de un subgrupo específico de pacientes. Heindl et al,¹⁴⁹ describieron en pacientes con mutaciones en *PTEN* con complicaciones linfoproliferativas y autoinmunes con un aumento de la fosforilación de S6 y de Akt. Este subgrupo de pacientes IDCV sólo presenta fosforilación de S6 aumentada con respecto al resto de los pacientes IDCV sin dicha complicación, pero no presentan diferencias con respecto a los controles. Así

dentro de la patogenia de IDCV, con defectos en la señalización y homeostasis del linfocito B, identificamos los que presentan este tipo de complicaciones con un aumento en la señalización de esta vía con respecto al resto de pacientes sin complicaciones ¹⁴⁹.

Este análisis, abre la posibilidad de que el estudio detallado de esta vía en los pacientes con IDCV, permita identificar un grupo de pacientes con actividad basal incrementada, que en caso de presentar manifestaciones autoinmunes pueden beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la vía como la rapamicina (inhibidor de m-TOR) o de los nuevos compuestos en fase de ensayo clínico que directamente inhiben la vía de la PI3K.

Expresión microARNs

Los microARNs están considerados reguladores post-transcripcionales de la expresión génica y en concreto están implicados en ciertos aspectos claves del desarrollo de la célula B. En los últimos años han adquirido gran relevancia como biomarcadores, puesto que están presentes en diversos fluidos (plasma, suero, orina) y tienen gran resistencia a la degradación ¹⁰⁵.

El análisis exploratorio de la expresión de microRNA en linfocitos B de pacientes IDCV se realizó mediante un microarray de expresión. El posible papel patogénico de los microARNs en el campo de las IDPs es hasta el momento inexplorado, por lo que se eligieron algunos microARN de los que no había nada descrito o relacionado específicamente con la biología del linfocito B, como es el caso de los microRNA: miR-340, miR-582, miR-376c y miR-32. La mayoría de estos microRNAs se han descrito en la literatura por su expresión e implicación en diversos tipos de cáncer.

Los microARNs seleccionados para validar muestran una expresión reducida en los pacientes IDCV con respecto a los controles, sin embargo la validación por Q-PCR no refrendó las diferencias observadas en el array, a excepción del miR-34a, como se comenta posteriormente. Cabe destacar por otro lado, la dificultad de observar

diferencias de expresión cuando la expresión de los microARN es tan baja tanto en pacientes como en controles.

El miR-340 está descrita su desregulación en diversos tumores, favoreciendo su crecimiento, migración, invasión y disminución de la apoptosis ^{150 151}. MiR-376c se ha descrito que está expresado a niveles muy bajos en cáncer de cervix, favoreciendo la proliferación e invasión de las células cancerígenas ¹⁵². El miR-582-5p se ha descrito su expresión incrementada en pacientes con tuberculosis activa, a través de su diana Foxo1, inhibe la apoptosis de los monocitos que es fundamental para defenderse de la infección ¹⁵³. El miR-32 tiene como dianas a PTEN un regulador negativo de la vía de señalización PI3K/Akt, la alta expresión de este microARN también favorece la proliferación y disminuye la apoptosis, este microARN está implicado en cáncer colorrectal ^{154 155}.

La expresión relativa de miR-32 por Q-PCR, aunque no refrenda los resultados del array, muestra sin embargo un dato interesante ya que diferencia claramente dos grupos de pacientes, por un lado los que expresan niveles parecidos a los controles, mientras que existe otro grupo de pacientes con ligero aumento en expresión de miR-32. Cabe destacar que en este grupo con mayor expresión, 6 de los 7 presentan complicaciones linfoproliferativas, de tipo adenopatías, LIP o hiperplasia nodular linfoide. Aunque hay otros 3 pacientes que también presentan dichas complicaciones y se encuentran dentro del grupo que expresan niveles de miR-32 reducidos parecidos a los controles.

Let-7e fue otro de los microARNs que cumplían los criterios de diferencia de expresión en el microarray entre pacientes y controles y que tenía descritas funciones relacionadas con el linfocito B. Pese a ello la validación por Q-PCR no arroja diferencias reseñables de expresión entre pacientes y controles. El miR-let7e forma parte de un grupo de microARNs entre los que se encuentran miR-125a y miR-99b, están más expresados en los centroblastos del CG que están continuamente en división ¹⁵⁶. Puesto que nuestras muestras de partida para el estudio de microARNs son células CD19⁺, es posible que expresándose a niveles tan reducidos no seamos capaces de discriminar diferencias de expresión de Let-7e entre pacientes y controles, en caso de que las hubiese.

De los 6 microARNs seleccionados para validar su expresión por Q-PCR, miR-34a era el único de ellos que en el microarray presentaba mayor expresión en los pacientes IDCV con respecto al grupo control (Figura 43). Y fue el único de los microARNs seleccionados donde la Q-PCR confirmó diferencias de expresión significativas entre pacientes y controles (Figura 44), mostrando los pacientes una mayor expresión de miR-34a. De las numerosas dianas descritas se seleccionaron dos de ellas de especial relevancia para la biología B: Bcl-2 y Foxp1. Hay que tener en cuenta que establecer los ARNm diana de los microARNs no es fácil debido a que la complementariedad de bases entre ambos es sólo parcial.

El aumento del miR-34a y sus consecuencias se han estudiado provocando dicho aumento de forma inducida en sistema celulares, así se ha descrito su implicación en apoptosis, arresto del ciclo celular y diferenciación. En cuanto a su papel en el ciclo celular resulta fácil de explicar puesto que tiene como dianas numerosas proteínas ciclinas (NMYC, CCND1, CCNE2, CDK4, CDK6 y MET) favoreciendo la parada del ciclo celular en estado quiescente en fase G0/G1. MiR-34a es a su vez una diana directa de p53, las mutaciones de p53 que producen su inactivación, o las que inactivan el sitio de unión a miR-34a pueden provocar la pérdida de expresión de este microARN ¹⁵⁷.

El miR-34a incidiendo en los niveles finales de proteínas de diferentes vías de señalización puede tener importantes repercusiones celulares. El eje formado por p53-miR34a-SIRT1 puede inducir senescencia de la célula. El eje formado por p53-miR34a-Foxp1 es importante para la supervivencia del estadio pre-B. Y en la apoptosis influye a través del eje p53-miR34a-Bcl-2 ^{102 157}. El papel de miR-34a en apoptosis también está descrito dentro de otra vía de conexión con CD95, identificando así a miR-34a como un marcador de células sensibles a la apoptosis mediada por CD95 ¹⁵⁸.

Algunos estudios califican a miR-34a como un microARN proapoptótico y supresor del crecimiento relacionado con p53 que es un oncogén que en situaciones normales mantiene una expresión reducida. Sin embargo, en respuesta al estrés genotóxico u oncogénico se activa, se incrementa su expresión que se irá acumulando en la célula hasta que llegado un momento a través de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 y de CD95 producirá una parada del ciclo celular y finalmente la muerte de la célula dañada por apoptosis. También se ha descrito que p53 induce una serie de microARNs, entre los que se encuentra miR-34a y que a su vez es también capaz de

regular al propio p53 por la inhibición de SIRT1, mientras que al contrario que p53, Myc disminuye la expresión de miR-34a que a su vez es capaz de regular a Myc ¹⁵⁹. En muchos tumores lo que ocurre es una desregulación de p53, con expresión muy baja y por tanto se inhibe la apoptosis y se facilita la progresión tumoral. De forma parecida ocurre con miR-34a cuya expresión se pierde en ciertos tumores favoreciendo así la proliferación ¹⁶⁰. Mientras que la expresión ectópica de miR-34a en diversas líneas celulares inhibe la progresión del ciclo celular. El efecto de miR-34a en apoptosis esta mediado tanto por una de sus dianas Bcl-2 como por la activación de caspasas. En cáncer el mecanismo más aceptado de apoptosis parece estar mediado por la vía p53-miR34a-Bcl-2 ^{157 161}. Los tres miembros de la familia miR-34, miR-34a localizado en 1p36 y los miembros b y c en 11q23, median la activación de p53 y de esta manera facilitan la senescencia, arresto o parada del ciclo celular y apoptosis en células primarias. Tanto miR-34b/c tienen capacidad de aumentar la radiosensibilidad y la apoptosis de tejidos malignizados. Por su parte toda la familia de miR-34 tiene sitios de unión muy conservados para p53, por lo que se consideran a su vez dianas directas de p53 ^{161 162 163}.

El efecto de miR-34a en procesos tumorales en los que tiene una expresión muy baja, se encuentra en una zona que suele sufrir deleciones en dichas condiciones, favorece la inhibición de la apoptosis y por tanto coopera en la mayor proliferación y crecimiento del tumor. Sin embargo, en otras situaciones como las descritas en células cancerígenas de esófago, existe una cooperación positiva entre NFκB y miR-34a. NFκB se une al promotor de miR-34a e induce la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis en este tipo de células tumorales siempre y cuando p53 no esté mutado ¹⁶⁴.

Nuestros resultados en células B totales indican un incremento de la expresión de miR-34a. Con los datos con los que disponemos hasta el momento, hemos encontrado correlación en los pacientes IDCV, entre el aumento de expresión de miR-34a y los niveles de la proteína Bcl-2 analizados por citometría de flujo sobre la población CD19⁺ total. Al correlacionar los niveles de miR-34a (analizados sobre CD19⁺ totales) y los niveles de proteína sí que se observa dicha correlación negativa. A niveles más altos de miR-34a en los linfocitos B de los pacientes IDCV hay menor expresión de una de sus dianas la proteína antiapoptótica Bcl-2, por lo que

efectivamente podría estar miR-34a implicado en la menor supervivencia y diferenciación de las células B en periferia de los pacientes con IDCV.

La implicación de miR-34a en la diferenciación B está presente en distintos estadios del desarrollo B. La expresión aberrante de miR34a en médula ósea provoca un bloqueo madurativo entre los estadios pro-B y pre-B, debido a la disminución de su diana directa Foxp1 a través de la región 3'UTR. Foxp1 un factor de transcripción imprescindible para la maduración B en médula ósea, de forma que la expresión constitutiva de miR-34a produce el bloqueo en los estadios madurativos ya comentados debido a que reduce la expresión de Foxp1 que provoca una menor eficiencia de las RAGs y de la recombinación V(D)J. El descenso de células B en médula ósea se traduce en un menor número de células que salen de la médula ósea y por tanto, un descenso de los linfocitos B circulantes en periferia. En cambio niveles reducidos de miR-34a favorece el aumento de expresión de Foxp1, que activa a otros factores de transcripción (E2A y Pax5), se facilita la unión a las RAGs, por lo que se asegura el compromiso con el linaje B y por tanto, la formación de células B maduras. La pérdida de expresión de miR34a sobre su otra diana Bcl-2, promueve la supervivencia de las células pro-B pero no su diferenciación^{102 157 165 166}.

Recientemente, dos artículos han descrito la alteración del compartimento linfóide en médula ósea en pacientes con IDCV, concretamente observan reducción de los estadios pre B II y de células inmaduras. En uno de los artículos la disminución de estos subtipos celulares va además acompañado del aumento del estadio pre-B-I^{130 131}. Por tanto, sería interesante analizar la expresión del miR-34a en diferentes poblaciones de precursores de células B en médula ósea de los pacientes con IDCV, especialmente en aquellos pacientes con reducción de linfocitos B en periferia.

La relevancia de la otra diana de miR34a, Foxp1 queda de manifiesto dado que es necesaria su expresión en las células del CG así como en las pre-CG; la desregulación en la expresión de Foxp1 en estos estadios también se ha comprobado en algunos tumores humanos¹⁶⁵. Foxp1 se une a genes implicados en el desarrollo de la reacción del CG, por lo que es necesaria la disminución de Foxp1 para que tenga lugar una correcta reacción y acabe habiendo diferenciación a células plasmáticas, mientras que su expresión constitutiva provoca alteraciones en la formación de dicho CG, así como uniones al gen de la IGH pudiendo dar lugar a linfomas de tipo MALT y DLBCL

¹⁶⁷. Además, la expresión aberrante de Foxp1 reduce la CSR hacia IgG y la sobreexpresión de Foxp1 en células B estimuladas reprimen PRDM1 (gen que codifica para Blimp-1 la proteína necesaria para la formación de células plasmáticas). La inducción de PRDM1, también está mediada por la señalización de NFκB que se produce a su vez por la activación mediada por IL-21 y CD40L, con la consiguiente inducción de algunos microARNs como son precisamente miR-34a, miR-155 y miR-183 ¹⁰¹.

La identificación y correlación *in vivo* de expresión de microARNs y sus ARNm dianas no resulta tarea fácil, más aún tratándose de análisis como es este caso de células B humanas primarias. La mayoría de estudios funcionales requieren para demostrar la significación de un microARN sobre una diana concreta, de ensayos de sobreexpresión o silenciamiento del microARN. Los datos aquí obtenidos, son los primeros descritos hasta el momento que relacionan la Inmunodeficiencia Común Variable con la alteración en la expresión de un microARN en células B primarias. Para profundizar y entender mejor su implicación en la inmunodeficiencia se necesita avanzar con estudios complementarios de sobreexpresión del miR-34a para descifrar por completo su papel en la patogenia de los pacientes con IDCV.

Las células *Naive* de los controles mantenidas en cultivo durante 4 días sin estímulos, muestran niveles reducidos de miR-34a como observamos en los ensayos y análisis de miR-34a en linfocitos B totales. En estas condiciones basales los controles expresan niveles de Bcl-2 que no parecen estar modificados por el miR-34a debido a su expresión reducida. Por ello, cuando se establece la correlación en controles sin activar entre miR-34a y la expresión relativa del ARNm de la proteína Bcl-2 hay una correlación positiva (coeficiente R positivo, aunque no significativo) de expresión de tanto el microARN como su diana Bcl-2. La activación con CD40L e IL-21 provoca en las células *Naive* de los controles un aumento del miR-34a que correlaciona con la disminución de su diana Bcl-2 (coeficiente R negativo, aunque no significativo).

La situación que se presenta en los pacientes IDCV es bien distinta, debida fundamentalmente a que los pacientes parten de unos niveles basales elevados de miR-34a, que sí que parece que estén influyendo en una menor expresión de los niveles de ARNm de Bcl-2 en las células *Naive* mantenidas durante 4 días sin estímulo. Dicha correlación negativa es estadísticamente significativa. La presencia de niveles altos de

miR-34a en las células *Naive*, es similar a los observados previamente sobre células B totales, hace que la estimulación con CD40L e IL-21 apenas modifique esos niveles, como si ocurre en los controles. De manera que inducción de miR-34a tras activación, es tan pequeña que, en las células *Naive* de los pacientes IDCV, no bloquea la expresión de Bcl-2, pero sí que se produce un mínimo aumento de los niveles de Bcl-2 debidos a la propia estimulación, es por eso que observamos una pequeña correlación positiva entre ambas variables (coeficiente R positivo entre miR-34a y Bcl-2) tras activación, aunque no significativa.

Resultaría interesante por confirmar si el aumento de miR-34a tan elevado que observamos en linfocitos B *Naive* de los pacientes, podría deberse a un aumento de p53 debido al estrés celular, que supone mantener las células 4 días en cultivo sin estímulo, que induce como se ha comentado anteriormente a miR-34a, en células particularmente sensibles como son los linfocitos B *Naive* de pacientes con IDCV^{157 158 161}. Según describió Borte et al,⁷⁵ las células *Naive* de los pacientes IDCV tienen una tasa de apoptosis espontánea mayor que los controles, pero esa tasa de apoptosis se ve reducida cuando estimulan las células *Naive* con CD40L IL4 e IL21 (asemejando los niveles de apoptosis parecidos entre pacientes y controles).

Tsai et al,¹⁰¹ llevaron a cabo la misma estimulación de células *Naive* de controles sanos, pero tras 5 días de cultivo aislaron las poblaciones CD38⁻ y CD38⁺ marcador indicativo de células plasmáticas. Observaron incrementos de varios microARNs entre ellos miR-34a, junto con miR-148a y miR-183, estos 3 microARNs suprimían la expresión de Bcl-6, Bach 2 y Foxp1.

En nuestro sistema de activación de células *Naive* con CD40L e IL-21 no observamos aumento significativo de miR-34a, ni correlación entre la expresión de miR-34a y Foxp1 tras activación de células *Naive* destacable ni en controles ni en pacientes. La diferencia con el estudio anterior, es que se recogen todas las células presentes tras 4 días de cultivo, sin diferenciar por la expresión de CD38 que estaría indicando aquellas que ya han empezado a diferenciarse a células plasmáticas.

Análisis metilación ADN

En un estudio previo, descrito en la Introducción, identificamos la menor desmetilación en genes relevantes en los linfocitos B Sm de los pacientes IDCV, primero detectamos esta variación en el miembro afecto de una pareja de gemelos idénticos discordantes para la enfermedad y después replicamos los hallazgos en una amplia cohorte de pacientes con IDCV de nuestra consulta¹²³.

En esta tesis hemos realizado una nueva aproximación, basada en los datos disponibles de un estudio del metiloma de distintas subpoblaciones B. Kulis et al,¹¹⁶ en concreto identificaron la hipometilación de numerosas CpG en genes relevantes para la biología de la célula B. Nuestros datos en una amplia cohorte de controles sanos corroboran esta tendencia a la desmetilación para las CpGs escogidas como en el trabajo original. Además, nosotros demostramos la alteración en la desmetilación en 7 de las CpGs estudiadas, en algunos de estos genes con relevancia funcional, en los linfocitos USm y en su mayoría Sm de pacientes IDCV.

En los pacientes con IDCV no todas las CpGs estudiadas presentan alteraciones en la desmetilación, por lo que no se trata de un evento inespecífico en los linfocitos B de memoria. Al menos para 3 de las CpGs estudiadas la desmetilación desde linfocitos B *Naïve* a linfocitos Sm no se observan diferencias con respecto a los controles. En esta situación está la CpG analizada en *BAFFR*. Este receptor de membrana está descrito que presenta una menor expresión en pacientes con IDCV, que por el contrario sí que expresan altos niveles de su ligando BAFF¹⁶⁸. Se cree que los mecanismos de regulación de *BAFFR* están controlados por los propios niveles de BAFF y que en el contexto de IDCV la alta expresión de BAFF puede estar provocando la internalización del receptor.

Las otras dos CpG que no muestran alteraciones en la desmetilación, son dos CpG en los genes *MALT1* y *BCL-10* ambos forman parte junto con *CARMA1* de un complejo que activa la vía clásica de NFκB. Este complejo es fundamental para la transmisión de la señal desde el BCR a la activación de kinasas que favorecen la transcripción de los componentes de NFκB. La disfunción de *BCL-10* se ha descrito

como causa de fenotipos clínicos más severos y con un mayor impacto en la desregulación del sistema inmune que la IDCV ¹⁶⁹. Para la CpG estudiada en *MALT1*, aunque no llega a haber diferencias significativas con respecto a los controles, las células Sm de los pacientes IDCV sí que presentan unos niveles de metilación algo superiores a los encontrados en controles. Las mutaciones con pérdida de función en *MALT1* dan lugar a una activación inadecuada de NFκB que favorece respuestas de tipo inflamatorias. En modelos murinos, también se ha descrito la inactivación de *MALT1* favorece un cambio desde un estado de tolerancia a autoinmunidad ^{49 170 171}.

El resto de CpG en las que se ha analizado el estado de metilación en las subpoblaciones B muestra tres tipos de patrones.

Por un lado, los dos pacientes que presentan una distribución de subpoblaciones B normal, tienen niveles de metilación más parecidos a los controles sanos. Lo que sugiere, que en estos pacientes con fenotipo B normal, el bloqueo en la diferenciación puede ser en estadios más tardíos de diferenciación final a células plasmáticas.

Por primera vez en el gen *FOXO* detectamos hipometilación en las células *Naive* de los pacientes IDCV en comparación con los controles sanos. *FOXO1* es un factor de transcripción que controla la expresión de diversos genes implicados en apoptosis, ciclo celular, longevidad y reparación del ADN. Forma parte del eje regulador *PI3K-AKT-FOXO* que es importante para los procesos de supervivencia, proliferación, activación y diferenciación B. Después de la unión del antígeno al BCR, se activa la señalización mediada por PI3K/AKT, Akt fosforila a Foxo provocando que se degrade en el citoplasma, se inhibe la actividad transcripcional de *FOXO* y hay progresión del ciclo celular. La regulación de *FOXO* por fosforilación también puede ser mediada por otras kinasas, a parte de Akt, puede que procesos como acetilación, monoubiquitinización y microARNs incluso estén regulando a los factores de transcripción *FOXO* ⁵⁴.

En células en estado basal, *FOXO* promueve la parada del ciclo celular, debido a que se une y activa a promotores de genes que suprimen la proliferación y supervivencia de los linfocitos B. En las células *Naive* de los pacientes IDCV, observamos defectos en la fosforilación a los 10 y 15 minutos de activación del BCR con respecto a los controles sanos. Además en los pacientes con IDCV las células *Naive* muestran hipometilación de *FOXO*. Ambos hallazgos nos llevan a especular, que el defecto de fosforilación de Akt puede estar sugiriendo una menor activación de la vía de PI3K-

AKT, una menor fosforilación y por tanto menor degradación de *FOXO*. Esto unido a la hipometilación pueden ser factores que estén contribuyendo a una mayor expresión de *FOXO*, que tal y como se ha descrito en modelos murinos, la sobreexpresión de *FOXO* da lugar a un aumento de la apoptosis y el retraso en la entrada del ciclo celular o parada del mismo ¹⁷².

Además PI3K-AKT y los niveles de *FOXO* están implicados en la decisión de diferenciación dependiente o no la reacción del CG. Si la señalización por la vía de PI3K-AKT es alta, aumenta la fosforilación de *FOXO*, se reducen los niveles de *FOXO* que hacen que los linfocitos se diferencien rápidamente a células plasmáticas, lo que ocurre para antígenos de alta afinidad y redundantes. Mientras que cuando la afinidad por el antígeno es menor, los linfocitos B deben especializarse, pasar por la reacción del CG y formar células B de memoria de alta afinidad para ese antígeno, en estos casos la actividad de la vía PI3K-AKT es baja y los niveles de *FOXO* elevados ^{50 54}. Parece por tanto, que esta vía requiere una exquisita regulación, y en los pacientes con IDCV existe desregulación ya que, por un lado observamos una menor fosforilación tras activación, junto con la hipometilación de *FOXO*. Es reseñable sin embargo, que en los linfocitos B circulantes de los pacientes, a pesar de la hipometilación observada en las células *Naive* mantiene una metilación elevada de la CpG cercana en las células Sm con respecto a los controles sanos. Dicha observación se hace aún más evidente en pacientes con reducción de linfocitos B de memoria.

La otra CpG estudiada de la vía PI3K-AKT-FOXO, es *AKT* en la que también los linfocitos Sm de los pacientes IDCV presentan niveles de metilación mayores, incrementado la metilación aún más, en los pacientes que tienen reducción de linfocitos B de memoria.

Para las CpG seleccionadas en *AID* y *BCL-6*, los linfocitos Sm de los pacientes muestran una media de metilación mayor, comparado con la media de los controles. Además, si subdividimos los pacientes atendiendo a las características del fenotipo B, se comprueba que también aparecen diferencias de metilación con respecto a los controles sanos en los linfocitos USm de los pacientes que presentan reducción de las subpoblaciones B de memoria. Estos resultados sugieren la posible relación entre la incapacidad de diferenciación hacia células B de memoria y un defecto en adquirir cambios de metilación del ADN, que la hipermetilación de estas CpGs puede estar

influyendo en el defecto de formación de dicho compartimento en los pacientes con IDCv.

Tanto *AID* como *BCL-6* tienen una relevancia fundamental en la reacción del CG y diferenciación de los linfocitos después del encuentro con el antígeno.

BCL-6 es el regulador de la reacción del CG, su expresión viene dada por modificaciones postransduccionales, los linfocitos B *Naive* expresan el ARNm de *BCL-6* pero no la proteína, que puede ser rápidamente generada después del encuentro con el antígeno³³. *BCL-6* se encarga de la represión de genes implicados en la activación de la célula B, es un regulador negativo del ciclo celular e impide la progresión a linfocitos B de memoria y la formación de células plasmáticas mediante la represión de *BLIMP-1*. Para que los linfocitos B salgan de la reacción del CG y continúen diferenciándose es necesario que los niveles de *BCL-6* disminuyan, existen varios mecanismos que regulan los niveles de *BCL-6* tanto de autorregulación como mecanismos extrínsecos. Por un lado, la activación del BCR, hace que las MAP kinasas fosforilen a *BCL-6* y se degrade en proteosomas. A nivel transcripcional también estímulos mediados a través de CD40 reducen los niveles del ARNm de *BCL-6*, la acetilación de *BCL-6* mediada por el complejo P300 también favorece la reducción de la actividad de *BCL-6*. Así mismo la activación de NFκB por la señalización mediada por BCR, CD40 y los TLRs que activan a IRF4 contribuye a la represión de *BCL-6*. En cuanto a los mecanismos de autorregulación, *BCL-6* se puede unir a su propio promotor y regular negativamente su transcripción³⁴. La importancia de estos mecanismos queda de manifiesto en las lesiones genéticas que suprimen esta actividad autorregulatoria en algunos tipos de linfomas. Algunas mutaciones en *BCL-6* hacen que se pierda la capacidad de autorregulación y que se mantengan niveles elevados que impiden la salida del CG y la diferenciación posterior de los linfocitos B, llegando incluso a favorecer la linfomagénesis¹⁷³.

En nuestro caso la alteración en la desmetilación del promotor de *BCL-6*, quizás pueda estar impidiendo una correcta autoinhibición, por cambios en la accesibilidad o unión al promotor, no se puede autorregular bien y esté contribuyendo a los defectos en la salida del CG y por tanto al bloqueo que existe en los linfocitos B de la IDCv^{34 174}.

Las células B requieren de cierta plasticidad para ir diferenciándose, desde el compromiso con el linaje linfóide de las células hematopoyética hasta la diferenciación

terminal en los órganos linfoides secundarios las células B sufren una reestructuración del metiloma. En concreto desde células *Naive* a células del GC deben sufrir una desmetilación, y aunque hay cierta controversia al respecto, algunos trabajos sostienen que podría estar en parte mediado por *AID* debido a su capacidad deaminasa. En el centro germinal además de los procesos de CSR e SHM, proliferación masiva, las células B sufren una hipometilación y un incremento de la diversidad de la metilación

175 .

En el caso de *AID*, es conocido el mecanismo de control epigenético al que está sometido este gen. *AID* sólo se expresa tras la activación de linfocitos B. En las células *Naive* su represión está mediada por metilación del ADN, en nuestros resultados observamos que tanto los linfocitos B *Naive* de pacientes IDCV y controles muestran unos niveles de metilación altos. En condiciones normales, se ha descrito que la diferenciación a partir de las células *Naive* al siguiente estadio de diferenciación, para que la maquinaria de CSR se posicione sobre las regiones V(D)J, sea necesario la desmetilación del ADN del promotor así como por la presencia de marcas de histonas permisivas, en concreto acetilaciones H3K9, H3K14, H4K8, H3K4me 3, H3K36 me 3 que favorecen una configuración abierta de la cromatina ²¹. También se ha sugerido, que para disminuir los niveles de *AID* tras los procesos de CSR e SHM, el promotor de *AID* se vuelve a metilar y que en cooperación también actúen en este propósito algunos microARNs como miR-155, miR-181b, miR-93 and miR-361 que se encargan de desestabilizar el ARNm de *AID* ²¹.

A partir de estudios en modelos murinos, se ha puesto de manifiesto la relevancia de la desmetilación del ADN en las regiones V(D)J del locus *Igk* para que la maquinaria de SHM y *AID* puedan acceder a esas regiones. La metilación del ADN previene que ocurra la SHM en zonas inadecuadas, así la metilación del ADN altera las modificaciones de histonas y la estructura de la cromatina para restringir el acceso de la maquinaria de SHM ^{176 177}.

En la CpG analizada, la desmetilación que muestran los controles no se corresponde con la hipermetilación observada en los pacientes. En el caso concreto de la desregulación de *AID* a través del presente trabajo, somos capaces de identificar varias alteraciones, por un lado hay niveles reducidos de expresión de *AID* en los pacientes

con IDCV, una aberrante desmetilación necesaria para que ocurra la progresión hacia linfocitos B de memoria junto con la disminución de la frecuencia de las SHM detectadas tanto en los linfocitos USm como Sm de los pacientes IDCV, todo ello puede estar contribuyendo a la reducida formación de las células de memoria en los pacientes IDCV. Los niveles reducidos de SHM indican una respuesta deficiente a antígenos asociada a una activación también alterada ⁷⁰.

Para *AID*, *BCL-6*, *FOXO* y *AKT1* la no desmetilación en los linfocitos Sm, o más bien niveles de metilación más altos se incrementan conforme se limita más el fenotipo B de los pacientes. Los niveles de metilación de las células de los pacientes, son más parecidos a los controles en aquellos pacientes con distribución de subpoblaciones B normales, aumenta la metilación en las células Sm en aquellos pacientes que tienen USm normales pero reducidas las Sm y la hipermetilación es más severa en los linfocitos Sm de los pacientes que presentan reducción de los linfocitos B de memoria totales.

Para la CpG cercana al promotor de *STAT3*, las células USm de los pacientes muestran menor desmetilación en comparación con los controles sanos. *STAT3* tiene una función relevante en la transmisión de la señal de IL10 e IL21 que favorece la diferenciación de células *Naive* a células de memoria y plasmáticas. Esta señalización está mediada por las kinasas JAK que se asocian a los receptores de citoquinas tras la unión de los ligandos y que fosforilan a los factores de transcripción *STAT*, favoreciendo la translocación al núcleo y la transcripción génica ¹⁷⁸. La activación de la IL-10 junto con CD40L facilita la cooperación de *STAT3* con la vía clásica de NFκB de forma que conjuntamente modulan las respuestas B frente a patógenos ¹⁷⁹. Por otro lado, se debe señalar que se han encontrado defectos en la fosforilación de *STAT3* en pacientes con IDCV, en concreto los linfocitos Sm tienen niveles de fosforilación de *STAT3* elevados que pueden estar relacionados con la alta susceptibilidad a la apoptosis que tienen estas células y que pueden contribuir a los defectos de la diferenciación B en los pacientes ¹⁸⁰.

Por último, en la CpG localizada en el gen *NFKB2* los niveles de metilación de las células USm y Sm de los pacientes son superiores a los detectados en las mismas subpoblaciones en los controles. Este gen forma parte de la vía alternativa de NFκB, que se activa en respuesta a la señalización por BAFFR y CD40 ⁶¹. *NFKB2* tiene

funciones sobre la maduración B pero también en el desarrollo del timo. Modelos murinos que no expresan *NFKB2*, presentan alteraciones estructurales de los nodulos linfáticos y el bazo que forman con CG no funcionales ¹⁸¹. También gracias a modelos murinos ha quedado de manifiesto la relevancia de *NFKB2* y *Rel B* en el mantenimiento de la reacción del CG, y que la delección de *NFKB2* provoca una alteración en la formación de células plasmáticas ⁶². Recientemente, se han descrito mutaciones en *NFKB2* asociadas con la patogenia de la IDCv, mutaciones que dan lugar a un codón de parada impidiendo las modificaciones postraduccionales de fosforilación y ubiquitinización que provoca una menor activación y translocación al núcleo de *NFKB2* ¹⁸¹. El patrón de metilación en los pacientes, muestra el fallo en la desmetilación de la CpG seleccionada durante la diferenciación B, que podría reducir la expresión de *NFKB2* y provocar anomalías estructurales de los CG, así como una reducida translocación de *NFKB2* al núcleo con la consiguiente alteración en la maduración de los linfocitos B y su diferenciación terminal.

Por último, el análisis de las divisiones celulares que han sufrido los linfocitos B de los pacientes, indican que aunque las células Sm llegan a dividirse un número parecido de veces similar a los controles sanos, el número de divisiones que acumulan desde el estadio *Naive* a las células Sm es menor que en los controles. Ello es debido a que las células *Naive* de los pacientes se dividen más veces de las normales.

No podemos establecer una relación general entre la metilación de las células Sm y el número de divisiones celulares. No observamos ningún tipo de correlación para los controles sanos, ni para la mayoría de los genes estudiados en la IDCv. Sin embargo, resulta interesante destacar que hay una correlación negativa entre el estado de metilación de las células Sm de los pacientes IDCv en los genes *AID* y *FOXO* y el número de divisiones celulares en la transición desde células *Naive* a células Sm. Ambos genes tienen relación funcional con el ciclo celular. Los factores de transcripción *FOXO* regulan la expresión de genes, como ya se ha mencionado anteriormente, implicados en apoptosis, ciclo celular, longevidad y reparación del ADN. *AID* por su parte inicia los procesos de SHM y CSR, que incluye proliferación de las células.

Una parte de estos resultados sugieren una relación potencial entre la alteración de los niveles de metilación en IDCv y la proliferación celular, lo que apoyaría la

noción de desmetilación pasiva durante la diferenciación de células B y desmetilación alterada en relación con las tasas de proliferación aberrante en los pacientes. Las DNMTs y las enzimas TET participan en las ganancias y pérdidas como mecanismos activos respectivamente de la metilación del ADN. Sin embargo, queda por confirmar la existencia de un mecanismo pasivo de desmetilación asociado a la proliferación y la división celular. La diferenciación terminal a células plasmáticas ha sido estudiado en mayor profundidad en ratones, quedando de manifiesto la importancia de la desmetilación, el aumento de la expresión génica y que los linfocitos B hayan sufrido un determinado número de divisiones celulares, para que alcancen con éxito el estadio de células plasmáticas con un programa transcripcional específico ¹²².

No podemos determinar, si la desmetilación aberrante presente en los linfocitos B de los pacientes con IDCV, es causa o consecuencia del menor número de divisiones celulares que sufren los pacientes con IDCV en la transición de células *Naive* a células Sm. Una posible explicación sea, que aunque los linfocitos B de los pacientes alcancen el estadio de memoria, debido a todas las alteraciones que presentan, están menos preparados para generar una correcta función.

Todo el epigenoma (metilación del ADN, modificaciones de histonas y la expresión de microARNs) así como los factores de transcripción modulan las respuestas de anticuerpos a antígenos. Cambios en el epigenoma pueden dificultar la accesibilidad de dichos factores de transcripción a las regiones de unión en los genes. En las células de memoria el epigenoma está listo para facilitar una respuesta más rápida y más robusta que en las *Naive* ²¹. La desregulación epigenética de las células B de memoria de los pacientes con IDCV, aquí mostradas como cambios en la desmetilación de CpG en genes claves para la diferenciación y activación de los linfocitos B, pueden dar lugar a respuestas inadecuadas e ineficientes a antígenos. La alteración en la desmetilación de genes como *STAT3*, *AKT1* y *FOXO* implicados en la señalización y supervivencia de los linfocitos B, así como *NFKB2*, *BCL-6* y *AID* implicados en el CG, en su conjunto puede que estén contribuyendo a una señalización y formación deficiente de la reacción del CG que lleva a la incapacidad de la diferenciación terminal de los linfocitos B y a la hipogammaglobulinemia característica de la patogenia de la Inmunodeficiencia Común Variable.

Conclusiones

Conclusiones

- 1) La menor expresión de la proteína con función antiapoptótica Bcl-2 en los linfocitos B de memoria de los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable podría contribuir a su reducida supervivencia.
- 2) Los linfocitos B *Naive* de los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable muestran una inducción reducida de los niveles de ARNm de *BCL-2* y *BCL-XL* tras activación con CD40L e IL-21. Esto sugiere un defecto en la señalización de la vía de NFκB y la posible implicación del aumento de la apoptosis como contribuidor del defecto B en los pacientes.
- 3) Los niveles reducidos de inducción de *AID* tras activación de células *Naive* y la disminución en la frecuencia de las hipermutaciones somáticas, sugieren un defecto en la diferenciación que sufren los linfocitos B en la Inmunodeficiencia Común Variable en la reacción del centro germinal y en la formación de células B de memoria.
- 4) Los linfocitos B de los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable muestran una menor fosforilación en las moléculas de señalización intermedias, Akt y S6, inducida por la activación del BCR. Esta menor fosforilación no está condicionada por menores niveles de las proteínas, que se expresan con igual intensidad en pacientes y controles.
- 5) Nuestros resultados sugieren por primera vez la implicación de los microARNs en la desregulación de los linfocitos B en la IDCv. El aumento de expresión del microARN-34a podría estar favoreciendo la apoptosis de los linfocitos B, así como impidiendo su correcta diferenciación a través del bloqueo de la expresión de su diana la proteína Bcl-2.

- 6) La alteración en la desmetilación de genes específicos con funciones en la señalización y supervivencia de los linfocitos B de memoria, así como otros genes implicados en la reacción del centro germinal, en su conjunto podrían estar contribuyendo como factores patogénicos a la alteración de linfocitos B en la Inmunodeficiencia Común Variable.
- 7) La hipermetilación de las CpGs analizadas en genes clave en células B de memoria con y sin cambio de isotipo, es más acusada en el subgrupo de pacientes con reducción de subpoblación de memoria. Lo que implica que la hipermetilación puede estar contribuyendo a los niveles reducidos de células de memoria en los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable.

Conclusions

- 1) The decreased expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 in memory B cells from Common Variable Immunodeficiency patients could contribute to their reduced survival.
- 2) *Naive* B cell from Common Variable Immunodeficiency patients present reduced upregulation of the target antiapoptotic mRNAs *BCL-2* and *BCL-XL* after CD40L and IL-21 stimulation, suggesting an impairment in the NFκB pathway and a possible role for increased apoptosis as a contributor to the B cell defect in these patients.
- 3) Reduced induction of *AID* after *Naive* B cell activation and the reduced frequency of somatic hypermutations, suggest the defect in B cell differentiation in the germinal center reaction and memory B cells formation in Common Variable Immunodeficiency patients.
- 4) Reduced Akt and S6 phosphorylation levels after BCR stimulation in B cells from CVID patients allude to activation defects mediated by phosphorylation in intermediate protein of the signaling pathway. Phosphorylations defects are not related to disturbance of total protein levels.
- 5) Our results point out for the first time, the implication of microRNAs in B cell deregulation from Common Variable Immunodeficiency patients. High levels of miR-34a could impact on B cell survival disrupting B cell differentiation, by targeting Bcl-2 protein expression.
- 6) The impaired demethylation in specific genes related to signaling, survival and germinal center reaction, could altogether contribute as pathogenic factors to the B cell disturbance of the B cell compartment in Common Variable Immunodeficiency.

7) The hypermethylation of the analyzed CpGs in clue genes in Switched memory B cells and Unswitched memory B cells is more intense in patients with severe reduction of memory B cells. This implies that hypermethylation could be contributing to the decreased percentages of memory B cells in Common Variable Immunodeficiency.

Bibliografía

1. Bonilla, F. A. *et al.* International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 38–59 (2016).
2. Chapel, H. Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID) ??? Diagnoses of Exclusion, Especially Combined Immune Defects. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 1158–1159 (2016).
3. Chapel, H. *et al.* Common Variable immunodeficiency disorders: Division into distinct clinical phenotypes. *Blood* **112**, 277–286 (2008).
4. Park, M. a, Li, J. T., Hagan, J. B., Maddox, D. E. & Abraham, R. S. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* **372**, 489–502 (2008).
5. Bogaert, D. J. A. *et al.* Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet.* jmedgenet-2015-103690 (2016). doi:10.1136/jmedgenet-2015-103690
6. van Zelm, M. C. *et al.* An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1901–1912 (2006).
7. Salzer, U. *et al.* Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat. Genet.* **37**, 820–828 (2005).
8. Wentink, M. W. J. *et al.* CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clin. Immunol.* (2015). doi:10.1016/j.clim.2015.08.010
9. Grimbacher, B. *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat. Immunol.* **4**, 261–268 (2003).
10. Lopez-Herrera, G. *et al.* Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 986–1001 (2012).
11. Schubert, D. *et al.* Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat. Med.* **20**, 1410–6 (2014).
12. Elgizouli, M. *et al.* Activating PI3K δ mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 1–9 (2015). doi:10.1111/cei.12706
13. Pedersen, A. S. *et al.* Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. (2016). doi:10.1056/NEJMoa1512234
14. Liu, Y. *et al.* Novel NFKB2 Mutation in Early-Onset CVID. *J. Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1007/s10875-014-0064-x
15. Poodt, a. E. J. *et al.* TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 35–39 (2009).
16. Maffucci, P. *et al.* Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
17. van Schouwenburg, P. A. *et al.* Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. *Clin. Immunol.* **160**, 301–314 (2015).
18. Yang, J. & Reth, M. The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* **584**, 4872–4877 (2010).

19. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K. & Rizzi, M. B cell biology: an overview. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **14**, 434 (2014).
20. Berkowska, M. a., van der Burg, M., van Dongen, J. J. M. & van Zelm, M. C. Checkpoints of B cell differentiation: Visualizing Ig-centric processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1246**, 11–25 (2011).
21. Zan, H. & Casali, P. Epigenetics of peripheral B-cell differentiation and the antibody response. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
22. Van Zelm, M. C., Van Der Burg, M. & Van Dongen, J. J. M. Homeostatic and maturation-associated proliferation in the peripheral B-cell compartment. *Cell Cycle* **6**, 2890–2895 (2007).
23. van Zelm, M. C., Szczepanski, T., van der Burg, M. & van Dongen, J. J. M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J. Exp. Med.* **204**, 645–55 (2007).
24. Berkowska, M. a. *et al.* Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* **118**, 2150–2158 (2011).
25. Seifert, M. & Kuppers, R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* **206**, 2659–2669 (2009).
26. Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 149–59 (2015).
27. Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 185–9 (2015).
28. Good, K. L., Bryant, V. L. & Tangye, S. G. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **177**, 5236–5247 (2006).
29. Avery, D. T. *et al.* B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* **207**, 155–171 (2010).
30. Nera, K.-P., Kyläniemi, M. K. & Lassila, O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand. J. Immunol.* **82**, 225–34 (2015).
31. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. IY30CH18-Nussenzweig Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol* **30**, 429–57 (2012).
32. Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* **509**, 637–40 (2014).
33. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
34. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 172–84 (2015).
35. Horiuchi, K. *et al.* Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 411–419.e1 (2014).
36. Hwang, J. K., Alt, F. W. & Yeap, L.-S. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0037-2014 (2015).
37. Hara, Y. *et al.* High affinity IgM+ memory B cells are generated through a germinal center-dependent pathway. *Mol. Immunol.* **68**, 617–627 (2015).
38. Weisel, F. J., Zuccarino-Catania, G. V., Chikina, M. & Shlomchik, M. J. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* **44**, 116–130 (2016).
39. Seifert, M. *et al.* Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory

responses and secondary germinal center reactions. doi:10.1073/pnas.1416276112

40. McHeyzer-Williams, L. J., Milpied, P. J., Okitsu, S. L. & McHeyzer-Williams, M. G. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* **16**, 296–305 (2015).
41. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 160–171 (2015).
42. Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 230–242 (2005).
43. Rakhmanov, M. *et al.* Circulating CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13451–13456 (2009).
44. Rakhmanov, M. *et al.* CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency do not show defects in receptor editing, but resemble tissue-like memory B cells. *Blood* **116**, 3682–3683 (2010).
45. Treanor, B. B-cell receptor: From resting state to activate. *Immunology* **136**, 21–27 (2012).
46. Harnett, M. M., Katz, E. & Ford, C. A. Differential signalling during B-cell maturation. *Immunol. Lett.* **98**, 33–44 (2005).
47. Donahue, A. C. & Fruman, D. a. PI3K signaling controls cell fate at many points in B lymphocyte development and activation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 183–197 (2004).
48. Reth, M. & Nielsen, P. *Signaling circuits in early B-cell development. Advances in Immunology* **122**, (Elsevier Inc., 2014).
49. Meininger, I. & Krappmann, D. Lymphocyte signaling and activation by the CARMA1-BCL10-MALT1 signalosome. *Biol. Chem.* **0**, 1–19 (2016).
50. Limon, J. J. & Fruman, D. A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* (2012). doi:10.3389/fimmu.2012.00228
51. Manning, B. D. Balancing Akt with S6K: Implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J. Cell Biol.* **167**, 399–403 (2004).
52. Jastrzebski, K., Hannan, K. M., Tchoubrieva, E. B., Hannan, R. D. & Pearson, R. B. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth factors* **25**, 209–226 (2007).
53. Fenton, T. R. & Gout, I. T. Functions and regulation of the 70 kDa ribosomal S6 kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 47–59 (2011).
54. Szydlowski, M., Jabłońska, E. & Juszczynski, P. FOXO1 transcription factor: a critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development. *Int. Rev. Immunol.* **33**, 146–57 (2014).
55. Hay, N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1965–1970 (2011).
56. Duronio, V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.* **415**, 333–44 (2008).
57. Bossen, C. & Schneider, P. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Seminars in Immunology* (2006). doi:10.1016/j.smim.2006.04.006
58. Rowland, S. L., Leahy, K. F., Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. *J. Immunol.* **185**, 4570–4581 (2010).

59. Woo, Y. J. *et al.* Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis B cells. *Exp. Mol. Med.* **43**, 350–357 (2011).
60. Opferman, J. T. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ.* **15**, 234–242 (2008).
61. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* (2004). doi:10.1016/j.it.2004.03.008
62. De Silva, N. S. *et al.* Transcription factors of the alternative NF- κ B pathway are required for germinal center B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 201602728 (2016).
63. Burlacu, a. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* **7**, 249–257 (2003).
64. Ulukaya, E., Acilan, C. & Yilmaz, Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem. Funct.* **29**, 468–480 (2011).
65. Chen, C., Edelstein, L. C., Gélinas, C. & Ge, L. The Rel / NF- κ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-x The Rel / NF- κ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-x L. **20**, 2687–2695 (2000).
66. Sen, R. Control of B Lymphocyte Apoptosis by the Transcription Factor NF- κ B. *Immunity* **25**, 871–883 (2006).
67. Taylor, J. J., Pape, K. A., Steach, H. R. & Jenkins, M. K. Humoral immunity. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell. *Science* **347**, 784–7 (2015).
68. Lang, J. *et al.* Enforced Bcl-2 Expression Inhibits Antigen-Mediated Clonal Elimination Of Peripheral B Cells In an Antigen Dose-Dependent Manner and Promotes Receptor Editing In Autoreactive, Immature B Cells. *J Exp Med* **186**, 1513–1522 (1997).
69. Merino, R., Ding, L., Veis, D. J., Korsmeyer, S. J. & Nuñez, G. Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J.* **13**, 683–691 (1994).
70. Driessen, G. J. *et al.* B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. *Blood* **118**, 6814–6823 (2011).
71. Cantaert, T. *et al.* Decreased somatic hypermutation induces an impaired peripheral B cell tolerance checkpoint. **126**, 1–14 (2016).
72. Saxon, A., Keld, B., Guo, B., Hart, N. S. T. & Lyon, L. B cells from a distinct subset of patients with common variable CD38 expression , and undergo enhanced apoptosis. **95**, 17–25 (1995).
73. Yazdani, R., Fatholahi, M., Ganjalikhani-hakemi, M. & Aghamohammadi, A. Role of apoptosis in common variable immunodeficiency and selective immunoglobulin A deficiency. *Mol. Immunol.* **71**, 1–9 (2016).
74. Clemente, A., Pons, J., Lanio, N., Matamoros, N. & Ferrer, J. M. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin. Exp. Immunol.* (2013). doi:10.1111/cei.12150
75. Borte, S. *et al.* Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood* **114**, 4089–4098 (2009).
76. Keller, B. *et al.* Disturbed canonical nuclear factor of κ ; light chain signaling in B cells of patients with common variable immunodeficiency. (2016). doi:10.1016/j.jaci.2016.04.043
77. Visentini, M. *et al.* Dysregulated extracellular signal-regulated kinase signaling associated with impaired B-cell receptor endocytosis in patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 401–410.e10 (2014).

78. Escobar, D. *et al.* Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell. Immunol.* **262**, 105–111 (2010).
79. van de Ven, A. a J. M., Compeer, E. B., van Montfrans, J. M. & Boes, M. B-cell defects in common variable immunodeficiency: BCR signaling, protein clustering and hardwired gene mutations. *Crit. Rev. Immunol.* **31**, 85–98 (2011).
80. Bayry, J. *et al.* Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood* **104**, 2441–2443 (2004).
81. Gao, Y. *et al.* Common variable immunodeficiency is associated with a functional deficiency of invariant natural killer T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1420–1428.e1 (2014).
82. Marashi, S. M. *et al.* Influence of cytomegalovirus infection on immune cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1349–1356.e3 (2012).
83. Giovannetti, A. *et al.* Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J. Immunol.* **178**, 3932–3943 (2007).
84. Mouillot, G. *et al.* B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J. Clin. Immunol.* **30**, 746–755 (2010).
85. Iglesias, J., Matamoros, N., Raga, S., Ferrer, J. M. & Mila, J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* (1999). doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00946.x
86. Bertinchamp, R. *et al.* Exclusion of Patients with a Severe T-Cell Defect Improves the Definition of Common Variable Immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **4**, 1147–1157 (2016).
87. Coraglia, A. *et al.* Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. *J. Immunol. Res.* **2016**, (2016).
88. Barbosa, R. R. *et al.* Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* **34**, 573–583 (2014).
89. Visentini, M. *et al.* Telomere-dependent replicative senescence of B and T cells from patients with type 1a common variable immunodeficiency. *Eur. J. Immunol.* **41**, 854–862 (2011).
90. Foerster, C. *et al.* B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. *J. Immunol.* **184**, 7305–7313 (2010).
91. Van De Ven, A. a J. M. *et al.* Defective calcium signaling and disrupted CD20-B-cell receptor dissociation in patients with common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, (2012).
92. Park, J. *et al.* Interferon Signature in the Blood in Inflammatory Common Variable Immune Deficiency. *PLoS One* **8**, 1–17 (2013).
93. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* **128**, 635–638 (2007).
94. Guil, S. & Esteller, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 87–95 (2009).
95. Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1057–1068 (2010).
96. Li, G., Zan, H., Xu, Z. & Casali, P. Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* **34**, 460–470 (2013).
97. Alberghini, F., Petrocelli, V., Rahmat, M. & Casola, S. An epigenetic view of B-cell disorders.

- Immunol. Cell Biol.* **93**, 253–60 (2015).
98. Zouali, M. The epigenetic landscape of B lymphocyte tolerance to self. *FEBS Lett.* **587**, 2067–2073 (2013).
 99. Mehta, A. & Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 279–294 (2016).
 100. Chen, C. Z., Schaffert, S., Fragoso, R. & Loh, C. Regulation of immune responses and tolerance: The microRNA perspective. *Immunol. Rev.* **253**, 112–128 (2013).
 101. Tsai, D.-Y. *et al.* Uncovering MicroRNA Regulatory Hubs that Modulate Plasma Cell Differentiation. *Sci. Rep.* **5**, 17957 (2015).
 102. Yébenes, V. G. De, Bartolomé-izquierdo, N. & Ramiro, A. R. Europe PMC Funders Group Regulation of B cell development and function by microRNAs. **253**, 25–39 (2013).
 103. Fernando, T. R., Rodriguez-Malave, N. I. & Rao, D. S. MicroRNAs in B cell development and malignancy. *J. Hematol. Oncol.* **5**, 7 (2012).
 104. Bao, Y. & Cao, X. Epigenetic Control of B Cell Development and B-Cell-Related Immune Disorders. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **50**, 301–311 (2016).
 105. Danger, R., Braza, F., Giral, M., Soulillou, J. P. & Brouard, S. MicroRNAs, major players in B cells homeostasis and function. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
 106. de Yébenes, V. G. *et al.* miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J. Exp. Med.* **205**, 2199–2206 (2008).
 107. Zan, H. & Casali, P. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity* **46**, 83–101 (2013).
 108. Basso, K. *et al.* BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155. *J. Exp. Med.* **209**, 2455–65 (2012).
 109. Belver, L., de Yébenes, V. G. & Ramiro, A. R. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity* **33**, 713–722 (2010).
 110. Marques, S. C. *et al.* MicroRNAs in B-cells: from normal differentiation to treatment of malignancies. *Oncotarget* **6**, 7–25 (2015).
 111. Espada, J. & Esteller, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 238–246 (2010).
 112. Rodríguez-Cortez, V. C., del Pino-Molina, L., Rodríguez-Ubreva, J., López-Granados, E. & Ballestar, E. Dissecting Epigenetic Dysregulation of Primary Antibody Deficiencies. *J. Clin. Immunol.* 1–9 (2016). doi:10.1007/s10875-016-0267-4
 113. Barneda-Zahonero, B., Roman-Gonzalez, L., Collazo, O., Mahmoudi, T. & Parra, M. Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming. *Comp. Funct. Genomics* **2012**, (2012).
 114. Zilbauer, M. *et al.* Genome-wide methylation analyses of primary human leukocyte subsets identifies functionally important cell-type-specific hypomethylated regions. *Blood* **122**, (2013).
 115. Granados, E. L. © 2011 Copyright Landes Bioscience . Not for Distribution . EPIGENETIC CONTROL OF LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION © 2011 Copyright Landes Bioscience . Not for Distribution . 26–35
 116. Kulis, M. *et al.* Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet* **47**, 746–756 (2015).
 117. Mandel, E. M. & Grosschedl, R. Transcription control of early B cell differentiation. *Curr. Opin.*

- Immunol.* **22**, 161–167 (2010).
118. Su, I. & Tarakhovsky, A. Epigenetic control of B cell differentiation. *Semin. Immunol.* **17**, 167–72 (2005).
 119. Li, G., Zan, H., Xu, Z. & Casali, P. Epigenetics of the antibody response. *Trends in Immunology* (2013). doi:10.1016/j.it.2013.03.006
 120. Lai, A. Y. *et al.* Dna methylation profiling in human b cells reveals immune regulatory elements and epigenetic plasticity at alu elements during b-cell activation. *Genome Res.* **23**, 2030–2041 (2013).
 121. Caron, G. *et al.* Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Rep.* **13**, 1059–1071 (2015).
 122. Barwick, B. G., Scharer, C. D., Bally, A. P. R. & Boss, J. M. supplement-Plasma cell differentiation is coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. *Nat. Immunol.* 0–5 (2016). doi:10.1038/ni.3519
 123. Rodríguez-Cortez, V. C. *et al.* Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms8335
 124. Chow, S. *et al.* Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytom. Part A* **67**, 4–17 (2005).
 125. Gathmann, B. *et al.* Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 116–126.e11 (2014).
 126. Wehr, C. *et al.* The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* **111**, 77–85 (2008).
 127. van Schouwenburg, P. a. *et al.* Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. *Clin. Immunol.* **160**, 301–314 (2015).
 128. Aghamohammadi, A. *et al.* Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **147**, 87–92 (2008).
 129. Jain, A. *et al.* Specific NEMO mutations impair CD40-mediated c-Rel activation and B cell terminal differentiation. *J. Clin. Invest.* **114**, 1593–1602 (2004).
 130. Gomes Ochrop, M. L. *et al.* T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-11-321695
 131. Anzilotti, C. *et al.* Key stages of bone marrow B-cell maturation are defective in patients with common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 487–490 (2015).
 132. Wehr, C. *et al.* The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* (2008). doi:10.1182/blood-2007-06-091744
 133. Knight, A. K. & Cunningham-Rundles, C. Inflammatory and autoimmune complications of common variable immune deficiency. *Autoimmun. Rev.* **5**, 156–159 (2006).
 134. Notarangelo, L. D. Primary immunodeficiencies (PIDs) presenting with cytopenias. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 139–143 (2009). doi:10.1182/asheducation-2009.1.139
 135. Yong, P. F. K., Thaventhiran, J. E. D. & Grimbacher, B. ‘A Rose is a Rose is a Rose,’ but CVID is Not CVID. *Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011? Advances in Immunology* **111**, (Elsevier Inc., 2011).
 136. Maglione, P. J., Overbey, J. R., Radigan, L., Bagiella, E. & Cunningham-Rundles, C. Pulmonary

- radiologic findings in common variable immunodeficiency: Clinical and immunological correlations. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **113**, 452–459 (2014).
137. Malamut, G. *et al.* The enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2262–2275 (2010).
 138. Agarwal, S., Smereka, P., Harpaz, N., Cunningham-Rundles, C. & Mayer, L. Characterization of immunologic defects in patients with common variable immunodeficiency (CVID) with intestinal disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 251–259 (2011).
 139. Uzzan, M., Ko, H. M., Mehandru, S. & Cunningham-Rundles, C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr. Gastroenterol. Rep.* **18**, (2016).
 140. Davey, A. M. & Pierce, S. K. Intrinsic differences in the initiation of B cell receptor signaling favor responses of human IgG(+) memory B cells over IgM(+) naive B cells. *J. Immunol.* **188**, 3332–41 (2012).
 141. Ding, B. B., Bi, E., Chen, H., Yu, J. J. & Ye, B. H. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J. Immunol.* **190**, 1827–1836 (2013).
 142. Berard, M. *et al.* Activation sensitizes human memory B cells to B-cell receptor-induced apoptosis. *Immunology* **98**, 47–54 (1999).
 143. Kin, N. W. & Sanders, V. M. CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. *J. Immunol.* **179**, 1516–1523 (2007).
 144. Wu, C. *et al.* Soluble CD40 ligand-activated human peripheral B cells as surrogated antigen presenting cells: A preliminary approach for anti-HBV immunotherapy. *Virology* **7**, 370 (2010).
 145. Lougaris, V. *et al.* B Cell Responses to CpG Correlate with CXCL16 Expression Levels in Common Variable Immunodeficiency. *Sci. World J.* **2012**, 1–9 (2012).
 146. Groth, C. *et al.* Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 133–139 (2002).
 147. Toapanta, F. R., Bernal, P. J. & Szein, M. B. Diverse phosphorylation patterns of B cell receptor-associated signaling in naïve and memory human B cells revealed by phosphoflow, a powerful technique to study signaling at the single cell level. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–17 (2012).
 148. Lucas, C. L. *et al.* Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat. Immunol.* **15**, 88–97 (2014).
 149. Heindl, M. *et al.* Autoimmunity, intestinal lymphoid hyperplasia, and defects in mucosal B-cell homeostasis in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome. *Gastroenterology* **142**, 1093–1096.e6 (2012).
 150. Hou, X. & Qiao, H. Effect of miR-340 on gastric cancer cell proliferation and apoptosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 13108–13 (2015).
 151. Wu, Z. S. *et al.* MiR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer* **117**, 2842–2852 (2011).
 152. Deng, Y., Xiong, Y. & Liu, Y. miR-376c inhibits cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting BMI1. *Int. J. Exp. Pathol.* **97**, 257–265 (2016).
 153. Liu, Y., Jiang, J., Wang, X., Zhai, F. & Cheng, X. miR-582-5p Is Upregulated in Patients with Active Tuberculosis and Inhibits Apoptosis of Monocytes by Targeting FOXO1. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
 154. Wu, W. *et al.* MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN)

- expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol. Cancer* **12**, 30 (2013).
155. Zhu, G., Chai, J., Ma, L., Duan, H. & Zhang, H. Downregulated microRNA-32 expression induced by high glucose inhibits cell cycle progression via PTEN upregulation and Akt inactivation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 526–531 (2013).
 156. Gururajan, M. *et al.* MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. *Int. Immunol.* **22**, 583–592 (2010).
 157. Chen, F. & Hu, S. Effect of MicroRNA-34a in Cell Cycle , Differentiation , and Apoptosis : A Review. **26**, 79–86 (2012).
 158. Hau, A., Ceppi, P. & Peter, M. E. CD95 Is Part of a Let-7/p53/miR-34 Regulatory Network. *PLoS One* **7**, (2012).
 159. Lawrie, C. H. MicroRNAs and lymphomagenesis: A functional review. *Br. J. Haematol.* **160**, 571–581 (2013).
 160. Bailey, S. G., Sanchez-Elsner, T., Stephanou, A., Cragg, M. S. & Townsend, P. A. Regulating the genome surveillance system: MiRNAs and the p53 super family. *Apoptosis* **15**, 541–552 (2010).
 161. He, L. *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130–4 (2007).
 162. Zenz, T., Häbe, S., Denzel, T., Mohr, J. & Winkler, D. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53. *Blood* **114**, 2589–2598 (2009).
 163. Maki, Y. *et al.* MicroRNA miR-34b/c enhances cellular radiosensitivity of malignant pleural mesothelioma cells. *Anticancer Res.* (2012). doi:32/11/4871 [pii]
 164. Li, J. *et al.* Transcriptional activation of microRNA-34a by NF-kappa B in human esophageal cancer cells. *BMC Mol. Biol.* **13**, 4 (2012).
 165. Hu, H. *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat. Immunol.* **7**, 819–826 (2006).
 166. Rao, D. S. *et al.* MicroRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the forkhead box transcription factor Foxp1. *Immunity* **33**, 48–59 (2010).
 167. Sagardoy, A. *et al.* Downregulation of FOXP1 is required during germinal center B-cell function. *Blood* **121**, 4311–4320 (2013).
 168. Barbosa, R. R. *et al.* Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1007/s10875-014-0047-y
 169. Torres, J. M. *et al.* Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity. *J. Clin. Invest.* **124**, 5239–5248 (2014).
 170. Turvey, S. E. *et al.* The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) signalosome complex: Stepping into the limelight of human primary immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.jaci.2014.06.015
 171. Thome, M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 348–359 (2004).
 172. Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M. G., Chen, J. & Fruman, D. A. Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood* **104**, 784–787 (2004).
 173. Pasqualucci, L. *et al.* Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation

- in diffuse large B-cell lymphoma Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. **101**, 2914–2923 (2012).
174. Nera, K.-P., Kyläniemi, M. K. & Lassila, O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand. J. Immunol.* **82**, 225–34 (2015).
 175. Dominguez, P. M. *et al.* DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. *Cell Rep.* (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.08.036
 176. Fraenkel, S. *et al.* Allelic ‘choice’ governs somatic hypermutation in vivo at the immunoglobulin kappa-chain locus. *Nat. Immunol.* **8**, 715–22 (2007).
 177. Jolly, C. J. & Neuberger, M. S. Somatic hypermutation of immunoglobulin ?? transgenes: Association of mutability with demethylation. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 18–22 (2001).
 178. Kane, A. *et al.* STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Current Opinion in Immunology* (2014). doi:10.1016/j.coi.2014.01.015
 179. Lafarge, S. *et al.* Complexes between nuclear factor-κB p65 and signal transducer and activator of transcription 3 are key actors in inducing activation-induced cytidine deaminase expression and immunoglobulin A production in CD40L plus interleukin-10-treated human blood B c. *Clin. Exp. Immunol.* **166**, 171–183 (2011).
 180. Clemente, A. *et al.* Increased STAT3 phosphorylation on CD27+ B-cells from common variable immunodeficiency disease patients. *Clin. Immunol.* **161**, 77–88 (2015).
 181. Chen, K. *et al.* Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF-κB Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *Am. J. Hum. Genet.* (2013). doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.009

Anexo

Difusión de los resultados de la Tesis

Comunicaciones a congresos

L. del Pino Molina, J. Torres Canizales, O. Pernía Arias, O. Vera, A. Ferreira Cerdán, R. Rodríguez Pena, I. Íbañez de Cáceres, E. López Granados. “*Naive* B cells from CVID patients show decrease upregulation of antiapoptotic mRNA levels after activation with CD40L+IL-21” 17 th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), Barcelona 21-24 Septiembre, 2016.

L. del Pino Molina, E. López Granados. “New molecular insights of B cell pathogenesis in CVID” XXXIX Congreso Nacional Sociedad Española de Inmunología (SEI), Alicante 5-7 Mayo 2016.

L. del Pino Molina, E. López Granados. 1st Meeting of the B cell Network (Net-B), ISCIII, Madrid 7-8 Octubre 2015.

L. del Pino Molina, J. Torres Canizales, R. Pérez de Diego, R. Rodríguez Pena, A. Ferreira Cerdán, E. López Granados. “New approaches are needed for Common Variable Immunodeficiency subclassification”. XXXVII Congreso Nacional Sociedad Española de Inmunología (SEI), Salamanca 29 Mayo-1 Junio 2013.

Difusión de los resultados estrechamente relacionados con el tema de la tesis doctoral

Publicaciones

V. C. Rodríguez-Cortez, L. del Pino-Molina, J.Rodríguez-Ubreva, L. Ciudad, D. Gómez-Cabrero, C. Company, J. M. Urquiza, J. Tegnér, C. Rodríguez-Gallego, E. López-Granados & E. Ballestar. Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNAdemethylation during naïve-to-memory B-cell transition. Nature Communications. 6, Nature, 17/06/2015.

V. C. Rodríguez-Cortez, L. del Pino-Molina, J.Rodríguez-Ubreva, E. López-Granados & E. Ballestar. Dissecting Epigenetic Dysregulation of Primary Antibody Deficiencies. J Clin Immunology, 17/03/2016.

E. López-Granados, L. del Pino-Molina. Luces y sombras de la Inmunodeficiencia Común Variable. Inmunología SEI, VOL 34, N3-2015.

Comunicaciones a Congresos

L.del Pino Molina, B.S. Padilla, R. Rodríguez Pena, E. López Granados. “Estudio de la reconstitución del compartimento B en pacientes tratados con Rituximab”. V Jornada científica de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM), Madrid 15 Diciembre 2014.

B.S. Padilla, L.del Pino Molina, J. Torres Canizales, A. Ferreira Cerdán, R. Rodríguez Pena, E. López Granados. Poor B cell reconstitution in NHL and CLL patients treated with targeted B cell depletion. Symposium Neoplasbim “B cell malignancies: from the bench to the patient”. CNB, Madrid 23-24 Octubre 2015.